

Promotor zur epidermisspezifischen Transgenexpression in Pflanzen

5 Die vorliegende Erfindung betrifft Promotorregionen, unter deren Kontrolle
Transgene in Pflanzen epidermisspezifisch exprimiert werden können. Weiterhin
betrifft die Erfindung rekombinante Nukleinsäuremoleküle, die diese
Promotorregionen umfassen und transgene Pflanzen und Pflanzenzellen, die mit
diesen Nukleinsäuremolekülen transformiert wurden, sowie Verfahren zu deren
10 Herstellung. Außerdem betrifft die vorliegende Erfindung Nukleinsäuremoleküle
umfassend einen erfindungsgemäßen Promotor und Nukleinsäuresequenzen bzw.
Transgene, die Pathogenresistenz vermitteln können sowie mit diesen Nukleinsäure-
molekülen transformierte Pflanzen und Pflanzenzellen und Verfahren zu deren
Herstellung.

15 Als Promotoren werden allgemein diejenigen DNA-Bereiche eines Gens bezeichnet,
die stromaufwärts des Transkriptionsstartpunktes liegen und durch die der
Initiationspunkt und die Initiationshäufigkeit der Transkription und somit die
Expressionsstärke und das Expressionsmuster des kontrollierten Gens festgelegt
20 werden. An die Promotoren binden die RNA-Polymerase und spezifische, die RNA-
Polymerase aktivierende Transkriptionsfaktoren, um die Transkription zusammen
mit dem basalen Transkriptionskomplex zu initiieren. Die Wirksamkeit der Promo-
toren wird häufig durch zusätzliche DNA-Sequenzen, die Enhancer-Sequenzen,
gesteigert und reguliert, deren Position im Gegensatz zu der der Promotoren nicht
25 festgelegt ist. Diese regulatorischen Elemente können stromaufwärts, stromabwärts
oder in einem Intron des zu exprimierenden Gens liegen.

In der rekombinanten DNA-Technologie werden Promotoren in Expressionsvektoren
eingesetzt, um die Expression eines Transgens zu steuern, das in der Regel nicht das
30 natürlicherweise durch den Promotor regulierte Gen ist. Dabei kommt es wesentlich
auf die Spezifität des Promotors an, die bestimmt, zu welchem Zeitpunkt, in welchen
Gewebetypen und in welcher Intensität ein gentechnisch übertragenes Gen
exprimiert wird.

In der Pflanzenzucht wird die rekombinante DNA-Technologie häufig eingesetzt, um bestimmte nützliche Eigenschaften auf Nutzpflanzen zu übertragen, was zu einem höheren Ertrag, z. B. durch erhöhte Pathogenresistenz, oder zu verbesserten

5 Eigenschaften der Ernteprodukte führen soll. Dabei ist es häufig wünschenswert, dass das übertragene Gen nicht ubiquitär exprimiert wird, sondern nur in den Geweben, in denen die Transgenaktivität gewünscht wird, da sich die Anwesenheit des Transgenprodukts in manchen Geweben negativ auf normale physiologische Prozesse auswirken kann. So konnte etwa gezeigt werden, dass die Überexpression

10 einer anionischen Peroxidase unter der Kontrolle des ubiquitär wirkenden 35S-Promotors zum Welken von transgenen Tabakpflanzen führt, weil weniger Wurzelwachstum stattfindet und sich daher auch weniger Wurzelmasse bildet (Lagrimini et al. (1997) The consequence of peroxidase overexpression in transgenic plants on root growth and development. Plant Mol Biol. 33 (5), S. 887-895). Die

15 Überexpression der spi2-Peroxidase unter der Kontrolle des ebenfalls ubiquitär wirkenden Ubiquitin-Promotors führt zu einer reduzierten Epicotylbildung und einem reduzierten Längenwachstum verglichen mit Kontrollpflanzen (Elfstrand, M. et al. (2001) Overexpression of the endogenous peroxidase-like gene spi 2 in transgenic Norway spruce plants results in increased total peroxidase activity and

20 reduced growth. Plant Cell Reports 20 (7), S. 596-603). Abgesehen von negativen Effekten auf physiologische Prozesse soll in der Resistenzzüchtung häufig vermieden werden, dass das Transgenprodukt auch in den geernteten Pflanzenteilen vorliegt.

Deshalb wurden in den vergangenen Jahren Promotoren isoliert, die entweder

25 gewebespezifisch oder induzierbar wirken. Zu den gewebespezifischen Promotoren gehören etwa samen-, knollen- und fruchtspezifische Promotoren. Die induzierbaren Promotoren können beispielsweise durch chemische Induktion, durch Lichtinduktion oder andere Stimuli aktiviert werden.

Es ist auch wünschenswert, die Genexpression spezifisch in der Epidermis zu modulieren. Die Epidermis stellt das Abschlussgewebe der oberirdischen Organe höherer Pflanzen dar. Als solches bestehen die Aufgaben der Epidermis darin, einerseits den Wasser- und Stoffaustausch der Pflanze zu ermöglichen und
5 andererseits das Eindringen von Pathogenen in die Pflanze zu verhindern. Durch eine veränderte Genexpression in der Epidermis mit Hilfe geeigneter Promotoren und von ihnen gesteuerter Gene könnten diese Funktionen gezielt moduliert werden. In dikotyledonen Pflanzen wurden epidermisspezifische Promotoren bereits beschrieben. So konnte gezeigt werden, dass der Promotor des CER6- (CUT1-) Gens
10 aus Arabidopsis, das für ein kondensierendes Enzym bei der Wachssynthese kodiert, die epidermisspezifische Expression eines β -Glucuronidase-Reportergens bewirken kann (Hooker et al. (2002), Significance of the expression of the CER6 condensing enzyme for cuticular wax production in Arabidopsis, Plant Physiol. 129(4), S. 1568-1580; Kunst et al. (2000), Expression of the wax-specific condensing enzyme CUT1
15 in Arabidopsis, Biochem. Soc. Trans. 28(6), S. 651-654).

Jedoch ist es bisher nicht gelungen, geeignete epidermisspezifische Promotoren in monokotyledonen Pflanzen, die sich für die Expression von Transgenen in Monokotyledonen, insbesondere Poaceen (Süßgräsern), besonders gut eignen, zu
20 identifizieren. Deshalb wurden bisher konstitutive Promotoren wie der Ubiquitin-Promotor aus Mais verwendet, um Proteine in der Epidermis zu exprimieren (siehe z. B. Oldach et al. (2001), Heterologous expression of genes mediating enhanced fungal resistance in transgenic wheat, Mol Plant Microbe Interact. 14(7), S. 832-838). Dies kann aber, wie oben beschrieben, zu unerwünschten Nebeneffekten bei
25 den transgenen Pflanzen aufgrund der Anwesenheit des Transgenprodukts in anderen Geweben bzw. Organen als der Epidermis führen.

Aufgabe der Erfindung ist es daher, Mittel bereitzustellen, die eine epidermisspezifische Genexpression in Monokotyledonen, bevorzugt in
30 Getreidepflanzen, ermöglichen.

- 4 -

Diese Aufgabe wird gelöst durch die Bereitstellung der in den Patentansprüchen charakterisierten Ausführungsformen.

5 Somit betrifft die vorliegende Erfindung eine Promotorregion mit Spezifität für die pflanzliche Epidermis, umfassend eine erste, aus dem Promotor des Gens Glutathion-S-Transferase A1 (GSTA1) stammende Sequenz, und eine zweite, aus dem Intron des Gens WIR1a stammende Sequenz. GSTA1 bezieht sich auf Gene, wie sie in
10 Dudler et al. (1991), A pathogen-induced wheat gene encodes a protein homologous to glutathione-S-transferases, Mol. Plant Microbe Interact. 4(1), S. 14-18 beschrieben sind. Insbesondere handelt es sich bei diesen Genen um Gene aus Weizen, es kann sich aber auch um homologe Gene aus anderen Getreidepflanzen, vor allem Gerste, mit vergleichbarem Expressionsmuster und ähnlichem Genprodukt handeln. WIR1a
15 bezeichnet Gene, wie sie in Bull et al. (1992), Sequence and expression of a wheat gene that encodes a novel protein associated with pathogen defense, Mol. Plant Microbe Interact. 5(6), S. 516-519, beschrieben sind.

Bevorzugt handelt es sich bei der ersten Sequenz um SEQ ID Nr. 1 und bei der zweiten Sequenz um SEQ ID Nr. 2.

20

Zwischen der ersten und der zweiten Sequenz können weitere, untranslatierte Sequenzen liegen, die eine Länge von 10bp bis 1000bp, bevorzugt von 20bp bis 800bp, besonders bevorzugt von 30bp bis 500bp und am meisten bevorzugt zwischen 40bp und 300bp aufweisen.

25

Besonders bevorzugt handelt es sich bei der erfindungsgemäßen Promotorregion um eine Promotorregion, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus

- a) Promotorregionen, die die unter SEQ ID Nr. 3 angegebene Nukleinsäuresequenz umfassen;

- 5 -

- b) Promotorregionen, die einen funktionalen Teil der unter SEQ ID Nr. 3 angegebenen Nukleinsäuresequenz umfassen oder
 - c) Promotorregionen, die eine Sequenz aufweisen, die unter stringenten Bedingungen
- 5 mit der unter SEQ ID Nr. 3 angegebenen Nukleinsäuresequenz hybridisiert.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wird unter einer Promotorregion eine Nukleinsäuresequenz verstanden, die die zur Expression einer kodierenden Sequenz

10 (Transgen) notwendigen regulatorischen Sequenzen umfasst. Regulatorische Sequenzen bilden denjenigen Teil eines Gens, der die Expression einer kodierenden Sequenz bestimmt, also vor allem das Expressionsniveau und -muster. Die regulatorischen Sequenzen besitzen mindestens ein Sequenzmotiv, an das spezifische Transkriptionsfaktoren und die RNA-Polymerase binden, zum

15 Transkriptionskomplex assemblieren und die Transkription der von der Promotorregion kontrollierten Nukleinsäuresequenz wirksam initiieren.

Die erfindungsgemäßen Promotorregionen basieren auf der Beobachtung, dass durch Fusion des Promotors des GSTA1-Gens aus Weizen mit intronischen Sequenzen des

20 WIR1a-Gens aus Weizen Promotoren mit neuen Eigenschaften hergestellt werden können.

In transienten Reporterassays in Weizenblättern mit einem β -Glucuronidase-(GUS)-Gen aus *E. coli* als Reporter gen wurden verschiedene Kombinationen des

25 WIR1a-Promotors und -Introns und des GST-Promotors getestet. Es zeigte sich überraschenderweise, dass GST-Promotor und WIR1a-Intron einen synergistischen Effekt auf die Reporter gen-Aktivität ausüben. Die Steigerung der transkriptionellen Aktivität war vergleichbar mit der durch den ubiquitär exprimierten 35S-Promotor erzielten transkriptionellen Aktivität.

- 6 -

Unter dem Begriff „epidermisspezifisch“ wird im Rahmen der vorliegenden Erfindung verstanden, dass eine unter der Kontrolle der erfindungsgemäßen Promotorregion stehende Nukleinsäuresequenz in der Spross epidermis von Pflanzen exprimiert wird. Insbesondere ist Epidermisspezifität im Sinne der vorliegenden

5 Erfindung auch dann gegeben, wenn die erfindungsgemäße Promotorregion die Expression eines Fremdgens in der Epidermis im Vergleich zu anderen Zelltypen begünstigt und in der Epidermis eine signifikant, wie mindestens 2-fach, bevorzugt mindestens 5- fach und besonders bevorzugt mindestens 10- und am meisten bevorzugt 50-fach gegenüber anderen Zelltypen erhöhte Expression bewirkt. Die

10 Expressionshöhe kann mit üblichen in situ-Nachweistechiken bestimmt werden.

Der Begriff „pflanzliche Epidermis“ ist dem Fachmann geläufig. Ergänzende Informationen sind in jedem Pflanzenanatomie- oder –physiologiebuch zu finden, wie etwa in Strasburger, Lehrbuch der Botanik, 35. Auflage 2002, Spektrum

15 Akademischer Verlag.

Es wurde nun überraschenderweise gefunden, dass eine Promotorregion, die sowohl regulatorische Sequenzen aus dem GSTA1-Gen aus Weizen als auch Intron-Sequenzen aus dem WIR1a-Gen aus Weizen umfasst, eine epidermisspezifische

20 Expression einer unter ihrer Kontrolle stehenden kodierenden Nukleinsäuresequenz bewirkt.

Neben einer Promotorregion, die die unter SEQ ID Nr. 3 dargestellten Nukleinsäuresequenzen aufweist, betrifft die vorliegende Erfindung auch Promotorregionen, die

25 die funktionalen Teile dieser Sequenz aufweisen und die in Pflanzen eine epidermisspezifische Expression einer von ihnen kontrollierten kodierenden Nukleinsäuresequenz bewirken.

Unter einem „funktionalen Teil“ werden in diesem Zusammenhang Sequenzen

30 verstanden, an die der Transkriptionskomplex trotz leicht abweichender

- 7 -

Nukleinsäuresequenz noch binden und epidermisspezifische Expression bewirken kann. Funktionale Teile einer Promotorsequenz umfassen auch solche Promotorvarianten, deren Promotoraktivität, verglichen mit dem Wildtyp, abgeschwächt oder verstärkt ist. Unter einem funktionalen Teil versteht man insbesondere auch natürliche oder künstliche Varianten der in SEQ ID Nr. 3 angegebenen Sequenz der Promotorregion. Mutationen umfassen Substitutionen, Additionen, Deletionen, Vertauschungen und/oder Insertionen eines oder mehrerer Nukleotidreste. Funktionale Teile der Promotorregionen umfassen im Rahmen der vorliegenden Erfindung natürlich vorkommende Varianten der SEQ ID Nr. 3 sowie künstliche, z. B. durch chemische Synthese erhaltene Nukleotidsequenzen.

Der verwendete Promotor enthält in jedem Fall eine TATA-Box (Positionen 2163 bis 2169 in SEQ ID Nrn. 1 und 3) und bevorzugt auch zwei CAAT-Boxen (Positionen 1047 bis 1051 bzw. 1895 bis 1899 in SEQ ID Nrn. 1 und 3). Weiterhin ist mindestens eines, bevorzugt mindestens zwei und drei, besonders bevorzugt mindestens vier, fünf und sechs, und am meisten bevorzugt sieben und acht der folgenden Sequenzmotive im Promotor enthalten:

- a) GTGGGGG
- b) ACGTGGA
- c) TCCACCT
- d) TATCCAT
- e) CATGCATG
- f) TGTAAG
- g) CCTACCA
- h) AATAGTA

Bevorzugt liegen die Sequenzmotive an den Positionen, die den folgenden Positionen in SEQ ID Nrn. 1 und 3 entsprechen:

- 8 -

- a) 185-191 und 217-223bp
 - b) 455-461bp
 - c) 508-514bp
 - d) 564-570bp
 - 5 - e) 1514-1521bp
 - f) 1520-1526bp
 - g) 1569-1575bp
 - h) 1610-1616bp
- 10 Gemessen werden kann die Promotoraktivität von Varianten der Promotorregion mit Hilfe von Markergenen, deren kodierende Sequenz unter der Kontrolle der zu untersuchenden Promotorregion steht. Geeignete Markergene sind beispielsweise das β -Glucuronidase-(GUS)-Gen aus *E. coli*, ein Fluoreszenzgen wie etwa das Green-Fluorescence-Protein (GFP)-Gen aus *Aequoria victoria*, das Luziferase-Gen aus
- 15 *Photinus pyralis* oder das β -Galaktosidase-(lacZ)-Gen aus *E. coli*. Die absolute Promotoraktivität wird bestimmt durch Vergleich mit einer Wildtyp-Pflanze. Die Gewebe- bzw. Zellspezifität lässt sich leicht durch Vergleich der Expressionsraten der oben genannten Markergene in den jeweiligen Geweben bzw. Zellen bestimmen.
- 20 Die vorliegende Erfindung betrifft ebenfalls Promotorregionen mit einer Nukleinsäuresequenz, die mit der unter SEQ ID Nr. 3 angegebenen Nukleinsäuresequenz unter stringenten Bedingungen hybridisiert. Der Begriff „Hybridisierung unter stringenten Bedingungen“ bedeutet im Zusammenhang dieser Erfindung, dass die Hybridisierung *in vitro* unter Bedingungen durchgeführt wird,
- 25 die stringent genug sind, um eine spezifische Hybridisierung zu gewährleisten. Solche stringenten Hybridisierungsbedingungen sind dem Fachmann bekannt und können der Literatur entnommen werden (Sambrook et al. (2001), Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York).

- 9 -

Allgemein bedeutet "spezifisch hybridisieren", dass ein Molekül unter stringenten Bedingungen präferenziell an eine bestimmte Nukleotidsequenz bindet, wenn diese Sequenz in einem komplexen Gemisch von (z. B. Gesamt-) DNA oder RNA vorliegt. Der Begriff „stringente Bedingungen“ steht allgemein für Bedingungen, unter denen
5 eine Nukleinsäuresequenz präferenziell an ihre Zielsequenz hybridisieren wird, und zu einem deutlich geringeren Ausmaß oder gar nicht an andere Sequenzen. Stringente Bedingungen sind z. T. Sequenz-abhängig und werden unter verschiedenen Umständen unterschiedlich sein. Längere Sequenzen hybridisieren spezifisch bei höheren Temperaturen. Im Allgemeinen werden stringente
10 Bedingungen so ausgewählt, dass die Temperatur etwa 5°C unter dem thermischen Schmelzpunkt (T_m) für die spezifische Sequenz bei einer definierten Ionenstärke und einem definierten pH liegt. Die T_m ist die Temperatur (unter definierter Ionenstärke, pH und Nukleinsäurekonzentration), bei der 50% der zu der Zielsequenz komplementären Moleküle zu der Zielsequenz im Gleichgewichtszustand
15 hybridisieren. Typischerweise sind stringente Bedingungen solche, bei denen die Salzkonzentration mindestens ungefähr 0,01 bis 1,0 M Natriumionen-Konzentration (oder ein anderes Salz) bei einem pH zwischen 7,0 und 8,3 beträgt und die Temperatur mindestens 30 °C für kurze Moleküle (also z. B. 10-50 Nukleotide) beträgt. Zusätzlich können stringente Bedingungen durch Zugabe destabilisierender
20 Agenzien, wie beispielsweise Formamid, erreicht werden.

Geeignete stringente Hybridisierungsbedingungen sind beispielsweise auch beschrieben in Sambrook et al., vide supra. So kann die Hybridisierung etwa unter den folgenden Bedingungen stattfinden:

- 25 - Hybridisierungspuffer: 2x SSC, 10x Denhardt's Lösung (Fikoll 400 + PEG + BSA; Verhältnis 1:1:1), 0,1% SDS, 5mM EDTA, 50mM Na_2HPO_4 , 250µg/ml Heringssperma-DNA; 50µg/ml tRNA oder 0,25M Natriumphosphatpuffer pH 7,2, 1mM EDTA, 7% SDS bei einer Hybridisierungstemperatur von 65°C bis 68°C

- 10 -

- Waschpuffer: 0,2x SSC, 0,1% SDS bei einer Waschttemperatur von 65°C bis 68°C

Vorzugsweise weisen derartige Promotorvarianten eine Sequenzidentität von
5 mindestens 50%, bevorzugt mindestens 70%, besonders bevorzugt mindestens 90%
und am meisten bevorzugt mindestens 95% zu der unter SEQ ID Nr. 3 angegebenen
Promotorsequenz oder Teilen davon auf, bezogen auf die gesamte in SEQ ID Nr. 3
gezeigte DNA-Sequenz. Vorzugsweise wird die Sequenzidentität derartiger
Promotorsequenzen durch Vergleich mit der unter SEQ ID Nr. 3 angegebenen
10 Nukleinsäuresequenz bestimmt. Wenn zwei unterschiedlich lange
Nukleinsäuresequenzen miteinander verglichen werden, bezieht sich die
Sequenzidentität vorzugsweise auf den prozentualen Anteil der Nukleotidreste der
kürzeren Sequenz, die identisch sind mit den entsprechenden Nukleotidresten der
längeren Sequenz.
15 Sequenzidentitäten werden üblicherweise über verschiedene Alignment-Programme,
wie z. B. CLUSTAL festgestellt. Allgemein stehen dem Fachmann zur Bestimmung
der Sequenzidentität geeignete Algorithmen zur Verfügung, z. B. auch das
Programm, das unter <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST> (z. B. der Link „Standard
20 nucleotide-nucleotide BLAST [blastn]“) zugänglich ist.

Die oben für SEQ ID Nr. 3 angegebenen prozentualen Identitätsgrade gelten ebenso
für die in SEQ ID Nrn. 1 und 2 gezeigten ersten und zweiten Sequenzen der
erfindungsgemäßen Promotorregion.

25 In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung weist die erfindungsgemäße
Promotorregion die gesamte unter SEQ ID Nr. 3 angegebene Sequenz von 2552
Nukleotiden auf.

Die vorliegende Erfindung betrifft auch chimäre Gene aus der erfindungsgemäßen Promotorregion und einer kodierenden Sequenz, deren Expression, die natürlicherweise nicht durch die erfindungsgemäßen Promotorregion reguliert wird, im chimären Gen durch die erfindungsgemäße Promotorregion reguliert wird, in
5 operativer Verknüpfung sowie rekombinante Nukleinsäuremoleküle, die diese chimären Gene enthalten.

Der Begriff „Nukleinsäuresequenz, deren Expression durch die erfindungsgemäße Promotorregion reguliert wird“ bedeutet, dass die Expression der
10 Nukleinsäuresequenz unter der Kontrolle der erfindungsgemäßen Promotorregion in den Zellen, in denen die Promotorregion aktiv ist, um mindestens den Faktor fünf, bevorzugt mindestens den Faktor 10 und besonders bevorzugt mindestens den Faktor 50 gegenüber Wildtyp-Zellen gesteigert werden kann.

15 Bei der Nukleinsäuresequenz, deren Expression durch die erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz reguliert wird, kann es sich um die kodierende Region eines Transgens handeln, z. B. eines Resistenzgens, dessen Genprodukt in der Epidermis erwünscht ist. Durch die Expression des Transgens kann der Gehalt des von ihm kodierten Genprodukts mindestens um den Faktor 2, bevorzugt mindestens um den
20 Faktor 5, besonders bevorzugt mindestens um den Faktor 10 und am meisten bevorzugt mindestens um den Faktor 50 erhöht werden.

Die erfindungsgemäße Promotorregion kann aber auch in RNAi-Konstrukten zur RNA-Interferenz eingesetzt werden, um das epidermisspezifische Silencing
25 bestimmter Gene zu erreichen, deren Genprodukte in der Epidermis nicht oder in geringerem Ausmaß als üblich anwesend sein sollen. Letzteres kann natürlich auch mit klassischen antisense- oder Kosuppressionskonstrukten unter Einsatz der erfindungsgemäßen Promotorregionen erreicht werden. Die Expression des endogenen Gens wird durch die Silencing-Konstrukte um mindestens 50%,

bevorzugt um mindestens 70%, besonders bevorzugt um mindestens 90% und besonders bevorzugt um mindestens 95% verringert.

5 In einem Konstrukt, das zur RNA-Interferenz verwendet werden soll, liegen üblicherweise palindromische DNA-Sequenzen vor, die nach der Transkription doppelsträngige RNA bilden. Diese doppelsträngige RNA wird durch das Dicer-Enzym zu kürzeren RNA-Stücken prozessiert, die an eine endogene RNA binden und deren Abbau mit Hilfe des RISC (RNA-induced silencing complex) bewirken (Hannon (2002) RNA interference, Nature, Bd. 418, S. 244-251).

10

Der Effekt der Gen-Silencing-Konstrukte auf die Expression des endogenen Gens kann mit Hilfe gängiger molekularbiologischer Methoden nachgewiesen werden, die dem Fachmann wohl bekannt sind. So stehen zur Untersuchung des RNA-Levels Northern-Blot- und RT-PCR-Verfahren zur Verfügung, das Protein kann durch 15 Western-Blot-Analysen, Immunfluoreszenzen oder, sofern es sich bei dem Protein um ein Enzym handelt, Enzymassays nachgewiesen werden.

Unter dem Begriff „Transgen“ werden im Rahmen der vorliegenden Erfindung diejenigen Gene zusammengefasst, deren Genprodukte in der Epidermis 20 bereitgestellt werden sollen, bzw. beim Gen-Silencing unterdrückt werden sollen.

Bei der Nukleinsäuresequenz, deren Expression unter der Kontrolle des erfindungsgemäßen Promotors steht, handelt es sich bevorzugt um eine Nukleinsäuresequenz, die Pathogenresistenz vermittelt, da die Epidermis die erste 25 Barriere darstellt, die von einem Pathogen beim Eindringen in die Pflanze überwunden werden muss.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wird unter dem Begriff „rekombinantes Nukleinsäuremolekül“ ein Vektor verstanden, der ein erfindungsgemäßes chimäres 30 Gen oder eine erfindungsgemäße Promotorregion enthält und die promotor-

- abhängige Expression der unter der Kontrolle der erfindungsgemäßen Promotorregion stehenden Nukleinsäuresequenz in Pflanzenzellen und Pflanzen bewirken kann. In einer bevorzugten Ausführungsform enthält ein erfindungsgemäßes rekombinantes Nukleinsäuremolekül zusätzlich transkriptionelle
- 5 Terminationssequenzen. Unter „transkriptionellen Terminationssequenzen“ werden dabei DNA-Sequenzen verstanden, die am Stromabwärts-Ende einer kodierenden Sequenz liegen und die RNA-Polymerase zum Stoppen der Transkription veranlassen.
- 10 Weiterhin betrifft die Erfindung Verfahren zur Herstellung transgener Pflanzen mit epidermisspezifischer Expression einer durch die erfindungsgemäße Promotorregion regulierten Nukleinsäuresequenz, umfassend die Schritte:
- a) Herstellung eines rekombinanten Nukleinsäuremoleküls, in der die erfindungsgemäße Promotorregion in operativer Verknüpfung mit einer
 - 15 kodierenden Sequenz vorliegt,
 - b) Übertragung des Nukleinsäuremoleküls aus a) auf pflanzliche Zellen und
 - c) Regeneration vollständig transformierter Pflanzen und, falls erwünscht, Vermehrung der Pflanzen.
- 20 Zur Vorbereitung der Einführung fremder Gene in höhere Pflanzen bzw. deren Zellen stehen eine große Anzahl von Klonierungsvektoren zur Verfügung, die ein Replikationssignal für *E. coli* und ein Markergen zur Selektion transformierter Bakterienzellen enthalten. Beispiele für derartige Vektoren sind pBR322, pUC-Serien, M13mp-Serien, pACYC184 usw. Das chimäre Gen kann an einer passenden
- 25 Restriktionsschnittstelle in den Vektor eingeführt werden. Das erhaltene Plasmid wird dann für die Transformation von *E. coli*-Zellen verwendet. Transformierte *E. coli*-Zellen werden in einem geeigneten Medium gezüchtet und anschließend geerntet und lysiert, und das Plasmid wird wiedergewonnen. Als Analysemethoden zur Charakterisierung der gewonnenen Plasmid-DNA werden im allgemeinen
- 30 Restriktionsanalysen, Gelelektrophoresen und weitere biochemisch-molekularbiolo-

gische Methoden eingesetzt. Nach jeder Manipulation kann die Plasmid-DNA gespalten und daraus gewonnene DNA-Fragmente mit anderen DNA-Sequenzen verknüpft werden.

- 5 Wie bereits erwähnt, stehen für die Einführung von DNA in eine pflanzliche Wirtszelle eine Vielzahl von Techniken zur Verfügung, wobei der Fachmann die jeweils geeignete Methode ohne Schwierigkeiten ermitteln kann. Diese Techniken umfassen die Transformation pflanzlicher Zellen mit T-DNA unter Verwendung von *Agrobacterium tumefaciens* oder *Agrobacterium rhizogenes* als
- 10 Transformationsmedium, die Fusion von Protoplasten, die Injektion, die Elektroporation, den direkten Gentransfer isolierter DNA in Protoplasten, die Einbringung von DNA mittels biolistischer Methoden sowie weitere Möglichkeiten, die bereits seit mehreren Jahren gut etabliert sind und zum üblichen Repertoire des Fachmanns in der pflanzlichen Molekularbiologie bzw. Pflanzenbiotechnologie
- 15 gehören. Die biolistische Gentransfermethode wird vor allem bei monokotyledonen Pflanzen verwendet. Hier findet der Fachmann nützliche Informationen zur Durchführung z.B. in Vasil et al. (1992) Bio/Technology, 10, S. 667-674; Vasil et al. (1993) Bio/Technology, 11, S. 1153-1158; Nehra et al. (1994) Plant J. 5, S. 285-297; Becker et al. (1994) Plant J., 5, S. 299-307; Altpeter et al. (1996) Plant Cell Reports
- 20 16, S. 12-17; Ortiz et al. (1996) Plant Cell Reports 15, S. 877-81; Rasco-Gaunt et al. (2001) J. Exp. Bot. 52; S. 865-874.

Bei der Injektion und Elektroporation von DNA in Pflanzenzellen werden per se keine speziellen Anforderungen an die verwendeten Plasmide gestellt. Ähnliches gilt

25 für den direkten Gentransfer. Es können einfache Plasmide, wie z.B. pUC-Derivate verwendet werden.

Sollen aber aus derartig transformierten Zellen ganze Pflanzen regeneriert werden, ist die Anwesenheit eines selektierbaren Markergens empfehlenswert. Dem Fachmann

sind die gängigen Selektionsmarker bekannt, und es stellt für ihn kein Problem dar, einen geeigneten Marker auszuwählen.

Je nach Einführungsmethode der gewünschten Gene in die Pflanzenzelle können
5 weitere DNA-Sequenzen erforderlich sein. Wird z.B. zur Transformation der
Pflanzenzelle das Ti- oder Ri-Plasmid verwendet, so muss mindestens die rechte
Begrenzung, häufig jedoch die rechte und linke Begrenzung der im Ti- bzw. Ri-
Plasmid enthaltenen T-DNA als Flankenbereich mit den einzuführenden Genen
verbunden werden. Werden zur Transformation Agrobakterien verwendet, muss die
10 einzuführende DNA in spezielle Plasmide kloniert werden, und zwar entweder in
einen intermediären oder in einen binären Vektor. Die intermediären Vektoren
können aufgrund von Sequenzen, die homolog zu Sequenzen in der T-DNA sind,
durch homologe Rekombination in das Ti- oder Ri-Plasmid der Agrobakterien
integriert werden. Dieses enthält außerdem die für den Transfer der T-DNA
15 notwendige *vir*-Region. Intermediäre Vektoren können allerdings nicht in
Agrobakterien replizieren. Mittels eines Helferplasmids kann der intermediäre
Vektor auf *Agrobacterium tumefaciens* übertragen werden (Konjugation). Binäre
Vektoren dagegen können sowohl in *E. coli* als auch in Agrobakterien replizieren.
Sie enthalten ein Selektionsmarkergen und einen Linker oder Polylinker, welche von
20 der rechten und linken T-DNA-Grenzregion eingerahmt werden. Sie können direkt in
die Agrobakterien transformiert werden. Das als Wirtszelle dienende Agrobakterium
soll ein Plasmid enthalten, welches das chimäre Gen innerhalb der T-DNA trägt,
welche in die Pflanzenzelle übertragen wird. Zusätzliche T-DNA kann vorhanden
sein. Das derartig transformierte Agrobakterium wird zur Transformation von
25 Pflanzenzellen verwendet. Die Verwendung von T-DNA für die Transformation von
Pflanzenzellen ist intensiv untersucht und ausreichend in allseits bekannten
Übersichtsartikeln und Handbüchern zur Pflanzentransformation beschrieben
worden. Für monokotyledone Pflanzen müssen für einen effektiven Agrobakterium-
vermittelten Gentransfer abgewandelte Protokolle angewandt werden, wie sie etwa in
30 Cheng et al. (1997) Plant Physiol. 115, S. 971-980; Khanna and Daggard (2003)

Plant Cell Reports 21, S. 429-436; Wu et al. (2003) Plant Cell Reports 21, S. 659-668; Hu et al. (2003) Plant Cell Reports 21, S. 1010-1019, beschrieben sind. Für den Transfer der DNA in die Pflanzenzelle können Pflanzen-Explantate zweckmäßigerweise mit *Agrobacterium tumefaciens* oder *Agrobacterium rhizogenes* kultiviert werden. Aus dem infizierten Pflanzenmaterial (z.B. Blattstücke, Stengelsegmente, Wurzeln, aber auch Protoplasten oder Suspensions-kultivierte Pflanzenzellen) können dann in einem geeigneten Medium, welches Antibiotika oder Biozide zur Selektion transformierter Zellen enthalten kann, wieder ganze Pflanzen regeneriert werden.

Ist die eingeführte DNA einmal im Genom der Pflanzenzelle integriert, so ist sie dort in der Regel stabil und bleibt auch in den Nachkommen der ursprünglich transformierten Zelle erhalten. Sie enthält normalerweise einen Selektionsmarker, der den transformierten Pflanzenzellen Resistenz gegenüber einem Biozid oder einem Antibiotikum wie Kanamycin, G 418, Bleomycin, Hygromycin, Methotrexat, Glyphosat, Streptomycin, Sulfonylharnstoff, Gentamycin oder Phosphinotricin u.a. vermittelt. Der individuell gewählte Marker sollte daher die Selektion transformierter Zellen gegenüber Zellen, denen die eingeführte DNA fehlt, gestatten. Hierzu sind auch alternative Marker geeignet, wie nutritive Marker oder Screeningmarker (wie GFP, green fluorescent protein). Selbstverständlich kann auch vollkommen auf Selektionsmarker verzichtet werden, was allerdings mit einem ziemlich hohen Screeningbedarf einhergeht. Falls markerfreie transgene Pflanzen erwünscht sind, stehen dem Fachmann auch Strategien zur Verfügung, die eine nachträgliche Entfernung des Markergens erlauben, z.B. Cotransformation oder Sequenz-spezifische Rekombinasen.

Die Regeneration der transgenen Pflanzen aus transgenen Pflanzenzellen erfolgt nach üblichen Regenerationsmethoden unter Verwendung bekannter Nährmedien. Die so erhaltenen Pflanzen können dann mittels üblicher Verfahren, einschließlich molekularbiologischer Methoden, wie PCR, Blot-Analysen, auf Anwesenheit und

- 17 -

Gewebespezifität der eingeführten Nukleinsäuresequenz, deren Expression von dem erfindungsgemäßen Promotor kontrolliert wird, bzw. der von ihr beeinflussten endogenen RNAs und Proteine untersucht werden.

- 5 Ferner betrifft die Erfindung transgene Pflanzen, die eine durch die erfindungsgemäße Promotorregion regulierte Nukleinsäuresequenz enthalten und diese epidermisspezifisch exprimieren.

- Bei den erfindungsgemäßen Pflanzen handelt es sich bevorzugt um
- 10 Monokotyledonen, insbesondere Getreidepflanzen wie Roggen, Mais und Hafer, besonders bevorzugt um Weizen oder Gerste, sowie transgene Teile dieser Pflanzen und deren transgenes Vermehrungsmaterial, wie Protoplasten, Pflanzenzellen, Kalli, Samen, Knollen oder Stecklinge, sowie die transgenen Nachkommen dieser Pflanze. Aber auch für andere Poaceen (Süßgräser) wie z. B. Futtergräser kann die
- 15 erfindungsgemäße Promotorregion zur Herstellung entsprechender Pflanzen mit epidermisspezifischer Expression von Transgenen eingesetzt werden.

- Unter der Kontrolle des erfindungsgemäßen, epidermisspezifischen Promotors können Gene für die Produktion epikutikulärer Wachse exprimiert werden, um die
- 20 Trockenheitstoleranz der Pflanzen zu erhöhen. Außerdem können unter der Kontrolle des erfindungsgemäßen Promotors Gene für die Produktion von Anthocyanen oder anderen UV-absorbierenden Substanzen zur Erhöhung der UV-Resistenz exprimiert werden. Wie oben bereits ausgeführt, werden bevorzugt Pathogen-Resistenzgene unter der Kontrolle des erfindungsgemäßen Promotors exprimiert.

25

Als Pflanzenpathogene werden unter anderem Bakterien, Viren und Pilze bezeichnet, die Pflanzen infizieren und dadurch den Stoffwechsel der Pflanze negativ beeinflussen.

Zu diesen Pflanzenpathogenen gehören Pilze, die bei Getreidepflanzen wie Weizen und Gerste unter anderem die Krankheiten Echter Mehltau und Halmbruchkrankheit auslösen. Diese Krankheiten können abhängig von der Befallsstärke erhebliche Ertragsverluste (bis zu 50%) verursachen.

5

Traditionell werden die oben genannten sowie weitere pflanzliche Pilzerkrankungen durch den Einsatz von Fungiziden bekämpft, die die bekannten Nachteile, wie Grundwassergängigkeit und Akkumulation in der Nahrungskette, besitzen.

- 10 In den letzten Jahren wurden aber auch einige Gene identifiziert, die Resistenz gegen einen bestimmten oder gegen mehrere Erreger vermitteln können. Der Begriff „Vermittlung von Pathogenresistenz“, wie er hier verwendet wird, bedeutet, dass Pflanzen, in denen die Expression der besagten Gene erhöht ist, gegenüber Pflanzen, in denen die Expression der besagten Gene normal ist, weniger empfänglich für die
- 15 Infektion mit bestimmten Pathogenen sind. Zu den Genen, die Pathogenabwehr vermitteln, gehören auch solche Gene, deren Expression durch Infektion mit einem Pathogen angeschaltet wird.

- Zu diesen Genen gehören Peroxidasen und Oxalat-Oxidasen. Die Oxalat-Oxidasen,
- 20 die zu der Familie der germinartigen Proteine gehören, katalysieren die Oxidation von Oxalat, wodurch Wasserstoffperoxid entsteht. Das Wasserstoffperoxid wirkt mikrobizid und kann die Lignifizierung der Zellwände fördern, wodurch das Eindringen von Schädlingen verhindert wird. Außerdem kann es in geringen Konzentrationen hypersensitiven Zelltod hervorrufen. Die Peroxidasen verwenden
- 25 entweder molekularen Sauerstoff oder Wasserstoffperoxid, um zelluläre Substrate zu oxidieren und dadurch zu entgiften.

- Pathogene, gegenüber denen die Expression der Oxalat-Oxidasen und Peroxidasen in der Epidermis von Pflanzen Resistenz vermitteln kann, schließen zum Beispiel ein:
- 30 Echter Mehltau, *Fusarium* spp., *Rhynchosporium secalis* und *Pyrenophora teres*.

- 19 -

Weitere Gene, die in der Lage sind, Resistenz gegen Pathogene zu vermitteln, sind Chitinasen, Ag-AFP, GSTA1 und WIR1a.

5 Durch die Expression der für diese Enzyme kodierenden Nukleinsäuresequenz in der Epidermis von transgenen Pflanzen mit Hilfe der erfindungsgemäßen Promotorregion können Pflanzen mit erhöhter Pathogenresistenz erhalten werden.

10 Im Gegensatz zu den Pathogenresistenz vermittelnden Genen gibt es auch pflanzeneigene Gene, die das Eindringen eines Pathogens fördern. Zu diesen gehört das Mlo-Gen, das für einen Sieben-Transmembran-Rezeptor kodiert, der das Eindringen des Mehltau-Pilzes in die Epidermis zu fördern scheint. In diesem Fall ist es sinnvoll, mit der Expression des Mlo-Gens zu interferieren, um das Eindringen von Pilzen in die Pflanze zu verhindern. Dies kann z. B. mit Hilfe der oben beschriebenen RNAi-Methode erfolgen. Dass die Interferenz mit der Expression des Mlo-Gens geeignet ist, das Eindringen des Mehltaupilzes in die Pflanze zu verhindern, wurde in vitro an Blattsegmenten aus Gerste gezeigt, die mit Wolfram-Teilchen beschossen wurden, die mit Mlo-dsRNA beschichtet worden waren (Schweizer et al. (2000), Double-stranded RNA interferes with gene function at the single-cell level in cereals, The Plant Journal, 24 (6), S. 895-903). Jedoch konnte 20 bisher nicht gezeigt werden, dass die epidermis-spezifische Interferenz mit der Mlo-Expression in transgenen Pflanzen den gleichen Effekt hat.

Weitere pflanzliche Gene, die die Interaktion eines Pathogens mit der Pflanze vermitteln und dadurch das Eindringen des Pathogens in die Pflanze fördern können, 25 sind beispielsweise Aminosäuren- oder Zuckertransporter oder Invertasen. Diese Gene eignen sich ebenfalls als Angriffspunkte für das Gen-Silencing. Somit betrifft die vorliegende Erfindung Verfahren zur Herstellung pathogen-resistenter Pflanzen, umfassend die Schritte:

- 20 -

- 5
- a) Herstellung eines rekombinanten Nukleinsäuremoleküls, in dem der erfindungsgemäße Promotor in operativer Verknüpfung mit einer Nukleinsäuresequenz, die Pathogenresistenz vermittelt, vorliegt,
 - b) Übertragung des rekombinanten Nukleinsäuremoleküls aus a) auf pflanzliche Zellen und
 - c) Regeneration vollständig transformierter Pflanzen und, falls erwünscht, Vermehrung der Pflanzen.

10 Bevorzugt handelt es sich bei der Pathogenresistenz vermittelnden Nukleinsäuresequenz um die kodierende Region eines Peroxidase- oder Oxalat-Oxidase-Gens oder um eine Sequenz, die mit der endogenen Mlo-RNA interferiert.

Die nachfolgenden Beispiele dienen zur Erläuterung der Erfindung und sollten nicht einschränkend verstanden werden.

15

Abbildungen:

- 1) Nukleinsäuresequenz des GSTA1-Promotors (SEQ ID Nr. 1)
- 20 2) Nukleinsäuresequenz des WIR1a-Introns (SEQ ID Nr. 2)
- 3) Nukleinsäuresequenz der bevorzugten Promotorregion (SEQ ID Nr. 3)
- 4) Nukleinsäuresequenz der TAPERO (Peroxidase) cDNA (SEQ ID Nr. 4)
- 25 5) TAPERO-Expressionsvektor pPS41
 - a) Nukleinsäuresequenz (SEQ ID Nr. 5)
 - b) Vektorkarte

- 6) Nukleinsäuresequenz der Germin 9f-2.8 (Oxalat-Oxidase) cDNA (SEQ ID Nr. 6)
- 7) Germin-Expressionsvektor pPS24
- 5 a) Nukleinsäuresequenz (SEQ ID Nr. 7)
b) Vektorkarte
- 8) Sequenz des Mlo-RNAi-Konstrukts (SEQ ID Nr. 8)
- 10 9) Mlo-RNAi-Expressionsvektor pWIR5-TaMlo-RNAi
a) Nukleinsäuresequenz (SEQ ID Nr. 9)
b) Vektorkarte
- 10) *In situ* Oxalatoxidase-Aktivität in pPS24-transgenen Pflanzen
- 15 Blätter von Bobwhite Wildtyppflanzen (BW) und von transgenen Linien Nr.157 und Nr. 170 wurden querschnitten und die Oxalatoxidase-Aktivität *in situ* nachgewiesen. Linke Spalte = Reaktion mit Oxalat-Substrat; rechte Spalte = Kontrollreaktion ohne Oxalat-Substrat. Die starke Violettfärbung zeigt Oxalatoxidase-Aktivität in der Epidermis der transgenen Linien an.
- 20 11) Nachweis des TAPERO-Transgens in pPS41-transgenen Pflanzen
a) im Northern Blot
- Nachweis der Akkumulation von TAPERO RNA mittels Hybridisierung einer WIR3 Probe an Northern blots aus transgenen Weizenlinien der T2 Generation, die das
- 25 pPS41 Konstrukt tragen. Es wurden je 2 Sublinien von 4 ausgewählten Linien plus Wildtyp (BW) im Adultpflanzenstadium analysiert. Blatt 1 = Fahnenblatt. Blätter 2-4 = zunehmend älter. Die TaGer-4 Sonde hybridisiert an eine Gruppe von stressinduzierten Weizengenen und wurde verwendet, um pleiotrope Nebeneffekte der TAPERO-Überexpression zu testen. Keine signifikante Nebenwirkung wurde
- 30 gefunden. EtBr = Beladungskontrolle der Gele, gefärbt mit Ethidiumbromid.

- 22 -

b) im Western Blot

Nachweis der Akkumulation des TAPERO-Proteins mittels Antikörperreaktion auf Western Blots von transgenen Weizenlinien der T2 Generation, die das pPS41
5 Konstrukt tragen. Das TAPERO-Transgenprodukt hat die erwartete Grösse von 31 kD. In Bobwhite, Blatt 3 ist eine erhöhte Basalaktivität des TAPERO Gens zu beobachten. Blatt 1 = Fahnenblatt. Coomassie stain = Ladungskontrolle der Gele, gefärbt mit Coomassie Blau R250.

10 12) Nachweis der epidermisspezifischen Transgenexpression

A) durch Northern Blot-Analyse

Nachweis der Anhäufung von Oxalatoxidase- (links) und TaPERO (rechts)-mRNA in der Blattepidermis von transgenen Pflanzen, die das pPS24- bzw. das pPS41-Konstrukt tragen, mit spezifischen Sonden. W = RNA aus ganzem Blatt; E = RNA
15 aus Blattepidermis. EtBr = Ethidiumbromid gefärbtes Gel als Ladungskontrolle; 26S RNA = Nachhybridisierung des Blots mit einer Sonde gegen die 26S ribosomale RNA als Ladungskontrolle.

B) durch Real-time reverse PCR-Analyse

20 Es wurde die Konzentration der TaPERO mRNA in Gesamtblatt und Epidermis der transgenen Linie Nr. 2013 (transformiert mit dem Konstrukt pPS41) bestimmt. Die Daten wurden anhand der konstitutiv exprimierten Kontrollgene UBC (Ubiquitin konjugierendes Enzym) und GAPDH (Glyceraldehyd-Phosphat Dehydrogenase) normalisiert. Die im Gesamtblatt verbleibende Expression stammt aus der nicht-
25 abgezogenen oberen Blattepidermis und aus dem Phloem (Nebenaktivität des Promotors).

C) durch Real-time reverse PCR-Analyse

Es wurden Wildtyp-Pflanzen (Bobwhite) und die transgenen Linien Nr. 2013 und Nr.
30 2151 (transformiert mit dem pPS 41-Konstrukt) im Adultpflanzenstadium analysiert.

- 23 -

Der Promotor wird vor allem in Blättern und Ähren stark exprimiert. In Stengel und Wurzeln wird das Transgen nicht oder nur schwach exprimiert.

13) Untersuchung der Mehltau-Resistenz von pPS41-transgenen Pflanzen

- 5 Das Fahnenblatt adulter Pflanzen wurde abgeschnitten und in einem „detached leaf assay“ mit Weizenmehltau inokuliert, zusammen mit Bobwhite Wildtyppflanzen. 7 Tage nach Inokulation wurde der Mehлтаubefall bonitiert. Mittelwerte aus 3 unabhängigen Inokulationsexperimenten mit Pflanzen der T2 und T3 Generation. Sublinie 2088/2 exprimiert kein TAPERO und ist nicht erhöht resistent. Mittelwert
10 "non-silenced" = Mittelwert aus allen Linien außer 2088/2 und allen Experimenten.

14) Sprosswachstum von pPS41-transgenen Pflanzen

- Pflanzen der T2 Generation wurden zusammen mit Bobwhite Wildtyppflanzen ausgesät und im Adultpflanzenstadium fotografiert.

15

15) Untersuchung der Mehltau-Resistenz von pWIR5-TaMlo-RNAi-transgenen Pflanzen

- Das Fahnenblatt adulter Pflanzen der T2 Generation wurde abgeschnitten und in einem „detached leaf assay“ mit Weizenmehltau inokuliert, zusammen mit Bobwhite
20 Wildtyppflanzen. 7 Tage nach Inokulation wurde der Mehлтаubefall bonitiert. Je 2 Sublinien pro Linie wurden getestet.

Beispiele:

25

- In den nachfolgenden Beispielen wurden molekularbiologische Standardmethoden wie *E.coli* Transformation, Restriktionsverdau, Ligation, DNA Extraktion, PCR etc., wie sie im Stand der Technik bekannt sind, gemäss Sambrook et al. (2001), vide supra, durchgeführt. Für alle PCR-Reaktionen wurde „proofreading“ *Pwo*
30 Polymerase (Roche) verwendet.

- 24 -

1) Herstellung des Promotorkonstruktes aus GSTA1-Promotor und WIR1a-Intron
(pPS18)

Die Herstellung erfolgte mehrstufig über folgende Vorläuferkonstrukte: pPS1, pPS3,
5 pPS15. Alle Konstrukte enthielten das GUS Reportergen, um sie direkt im
transienten Assay testen zu können.

pPS1:

Ein 1.9 kb Promotorfragment des WIR1a Gens wurde mit *Pst*I aus einem
10 rekombinanten pBluescript Klon herausgeschnitten und in die *Pst*I-Schnittstelle einer
Expressionskassette vor das GUS-Gen kloniert. Die Expressionskassette basierte auf
pBluescript und enthielt das GUS-Gen gefolgt vom Transkriptionsterminator des
Weizen GSTA1-Gens. Da das GUS-Gen und der GSTA1-Transkriptionsterminator
in den verwendeten finalen Konstrukten (siehe Beispiel 2) nicht mehr enthalten sind,
15 wird auf eine detaillierte Beschreibung dieser Expressionskassette verzichtet. Das
resultierende Konstrukt enthielt eine translationelle WIR1a::GUS Fusion.

pPS3:

Mit den Adaptor-Primern 5' ATA TAT CTG CAG GGA GCC ACG GCC GTC
20 CAC und 5' TAT CCC GGG CCC GTG CCT GGA CGG GAA wurde ein PCR
Fragment von ca. 240 bp erzeugt und dessen Enden mit *Sma*I und *Pst*I geschnitten
(auf Adaptor). Als PCR „template“ diente der genomische WIR1a Klon. Das PCR
Fragment enthielt die letzten 15 Aminosäuren des ersten Exons von WIR1a und das
Intron inklusive „splice site“ Akzeptor und wurde in pPS1, geschnitten mit *Pst*I
25 (partiell) und *Sma*I und über Agarose-Gelelektrophorese gereinigt, ligiert. Das
resultierende Konstrukt enthielt eine translationelle WIR1a::GUS Fusion mit dem
WIR1 Intron vor dem GUS Gen. Zudem wurde eine Deletion von Aminosäuren Nr.
18-35 des ersten Exons von WIR1a eingeführt, um die Sekretion des WIR1a::GUS
Fusionsproteins (durch Entfernen des Signalpeptids) zu verhindern.

- 25 -

pPS15:

Der WIR1a Promotor wurde durch ein PCR-Fragment des GSTA1-Promotors ersetzt. Zu diesem Zweck wurde pPS3 mit *Xho*I und *Sna*BI (partiell) verdaut und die Vektorbande über Agarose-Gelelektrophorese gereinigt. Das GSTA1-
5 Promotorfragment von ca. 2.3 kb Länge wurde mit den Adaptor-Primern 5'ATA TAT CTC GAG TCT AGA ACT AGT GGA TCC und 5'ATA TAT TAC GTA GTT TGT CCG TGA ACT TCA aus dem genomischen GSTA1 Klon mittels PCR amplifiziert und an den Enden mit *Xho*I und *Sna*BI geschnitten. Das PCR Fragment wurde mit der geleluerten pPS3 Bande ligiert, resultierend in einer translationellen
10 Fusion des intronenthaltenden WIR1a Genfragmentes mit GUS, unter der Kontrolle des GSTA1 Promotors.

pPS18:

pPS15 wurde mit *Pst*I und *Sna*BI (partiell) verdaut, die Vektorbande über Agarose-
15 Gelelektrophorese gereinigt und mit einem doppelsträngigen Oligonukleotid (5'GTA CAC AGG CAG CTA GCT CTC GAA ACC TCG CTC GAA ACG CA plus 5'CAT GTG TCC GTC GAT CGA GAG CTT TGG AGC GAG CTT TGC GT) ligiert. Dies ersetzte den Teil des WIR1a Gens um den Translationsstart (46 bp upstream bis 53 bp downstream des Translationsstarts) mit 42 bp der 5'UTR des
20 WIR1a-Gens ohne das Translationsinitiationskodon ATG. Das resultierende Konstrukt enthielt eine transkriptionelle Fusion des intronenthaltenden WIR1a Genfragmentes mit GUS, unter der Kontrolle des GSTA1 Promotors.

2) Herstellung der verwendeten Konstrukte

25 a) Expressionsvektor pPS24 (Oxalat-Oxidase-Expression unter der Kontrolle des erfindungsgemäßen Promotors)

Ein *Hind*III/*Sph*I Fragment von 745 bp Länge des Weizen gf-2.8 Gens (Oxalat-Oxidase; Acc. Nr. M63223) enthaltend den gesamten offenen Leserahmen (ORF) wurde in die pflanzliche Expressionskassette pGY1 subkloniert, was im Konstrukt
30 pGermin (beschrieben in Schweizer et al., 1999) resultierte. Für diese Klonierung

- 26 -

wurde das Oxalat-Oxidase-Fragment in einen Zwischenvektor ligiert, um das Fragment mittels der Restriktionsschnittstellen *Bam*HI und *Pst*I in pGY1 ligieren zu können. Aus pGermin wurde ein *Sma*I/*Eco*RI Fragment von ca. 1 kb Länge, enthaltend das Oxalat-Oxidase-Gen und den CamV 35S Terminator, in den

5 *Sma*I/*Eco*RI-geschnittenen und über Agarose-Gelelektrophorese gereinigten pPS18 Vektor ligiert. Das resultierende Konstrukt enthielt eine transkriptionelle Fusion des intronenthaltenden WIR1a Genfragmentes mit dem Oxalat-Oxidase-Gen unter der Kontrolle des GstA1 Promotors. Gegenüber pPS18 enthielt das Konstrukt nicht mehr den GstA1 Transkriptionsterminator, sondern denjenigen des CamV 35S Gens.

10

b) Expressionsvektor pPS41 (TAPERO-Expression unter der Kontrolle des erfindungsgemäßen Promotors)

Aus pWIR3 (enthaltend eine transkriptionelle Fusion zwischen dem CamV 35S Promotor und TAPERO; Schweizer et al., 1999) wurde ein TAPERO-Fragment von

15 ca. 1.2 kb Länge durch Restriktionsverdau mit *Sma*I und *Pst*I isoliert. Das TAPERO-Fragment wurde in Vektor pPS24, der mit *Sma*I und *Pst*I (partiell) verdaut und über Agarose-Gelelektrophorese gereinigt wurde, ligiert. Dies resultierte in einer transkriptionellen Fusion des intronenthaltenden WIR1a-Genfragmentes mit dem TAPERO-Gen (Acc. Nr. X56011), unter der Kontrolle des GstA1-Promotors, in dem

20 das Oxalat-Oxidase Gen durch das TAPERO-Gen ausgetauscht wurde. Wie pPS24 enthält pPS41 den Transkriptionsterminator des CamV 35S Gens.

c) Expressionsvektor pWIR5-TaMlo-RNAi (Expression des Mlo-RNAi-Konstrukts unter der Kontrolle des erfindungsgemäßen Promotors)

25 Zunächst wurde das im Vektor pGEM-Teasy subklonierte 3. Intron des *Mla*I Resistenzgens aus Gerste (ca. 1.1 kb) mittels *Eco*RI und *Pst*I isoliert und in den ebenfalls *Eco*RI und *Pst*I geschnittenen Vektor pBSw41 (pBluescript-Derivat mit partieller *TaMlo*I cDNA, kloniert von Candace Elliott im Rahmen ihrer Dissertation; GenBank accession no. AF361933) ligiert. Aus diesem Konstrukt wurde das *Mla*I

30 Intron zusammen mit einem Teil der codierenden Sequenz des *TaMlo*I-Gens als ca.

- 27 -

1.55 kb *Pst*I/*Msc*I-Fragment isoliert (= Fragment 1). Parallel hierzu wurde per PCR aus dem Plasmid pBSw41 mit den Oligonukleotiden T3 (Standard-Sequenzier-Primer für pBluescript) und TaMlo1-1 (5' GTC GCA TGC CTG TCC ACA CGA AAT GTG C 3', *Sph*I Restriktionsschnittstelle unterstrichen) ein ca. 450 bp großes
5 Fragment amplifiziert. Nachfolgend wurde das PCR-Fragment mit den Restriktionsenzymen *Pst*I und *Sph*I verdaut (= Fragment 2). Der Vektor pPS24 (Promotor + Oxalat-Oxidase, siehe oben) wurde mittels Restriktionsverdau mit *Sma*I und *Sph*I geöffnet und das herausgeschnittene Oxalat-Oxidase-Genfragment verworfen. In einer Drei-Komponenten-Ligation wurden sodann die oben
10 beschriebenen Fragmente 1 und 2 in den *Sma*I/*Sph*I geschnittenen Vektor pPS24 ligiert. Bei dieser Ligation sind die Enden der *Msc*I und *Sma*I geschnittenen Komponenten kompatibel, da es sich bei beiden um sogenannte „stumpfe Enden“ (blunt ends) handelt. Das resultierende Konstrukt (pTaMlo1 RNAi) enthält ca. 300 bp des *TaMlo1*-Gens sowie ca. 150 bp Polylinker/Adaptor-Sequenz als „inverted
15 repeats“, separiert durch das *Mla*I-Intron. Die Kontrolle dieser Transkriptionseinheit unterliegt dem GstA1 Promotor.

Anmerkung: Das hier aus historischen Gründen als *TaMlo1* bezeichnete Gen erhielt später die Bezeichnung *TaMloA1* (Elliott *et al.*, 2002). Mol. Plant Microbe Interact. 15: 1069-1077 (2002).

20

3) Transformation der Weizenpflanzen

Weizenpflanzen (cv. Bobwhite) wurden in Phytokammern für 40 Tage bei 15°C tagsüber und 12°C nachts unter Kurztagbedingungen (10h/d, ca. 600 µE) und nachfolgend im Gewächshaus bei 18/16°C und einer Photoperiode von mindestens
25 16 h angezogen. Die Ähren wurden entweder unmittelbar verwendet oder bis zu 5 Tage bei 4°C aufbewahrt. Die von der Ähre abgenommenen Karyopsen wurden für 2 Minuten mit 70% Ethanol und dann für 15 bis 20 Minuten in 5% Natriumhypochlorit-Lösung/ 0,1% Tween 20 oberflächensterilisiert und schließlich viermal mit sterilem Aqua bidest gewaschen.

30

- 28 -

Unreife Embryonen mit einer Größe von 0,5 bis 1,5 mm wurden unter sterilen Bedingungen aus den Karyopsen herauspräpariert und mit dem Scutellum nach oben auf Kallusinduktions-Medium in Petrischalen aufgelegt (Basismedium nach Murashige Skoog (1962) mit 2 mg/l 2,4-D, 40 g Maltose-Monohydrat, 500 mg/l L-Glutamin, 100 mg/l Caseinhydrolysat, 5 µM CuSO₄ und 0,25% Phytigel). Die Kulturen wurden bei 25°C im Dunkeln inkubiert.

Fünf bis sieben Tage nach Isolierung der Embryonen erfolgte die biolistische Transformation. Vier bis sechs Stunden vor dem Partikelbeschuss wurden die bereits proliferierenden Embryonen auf neues Medium mit verringertem Wasserpotenzial übertragen (wie oben, supplementiert mit 0,3 M Mannitol) und bei 25°C im Dunkeln inkubiert.

Das Plasmid pAHC20 (Christensen and Quail 1996), das das Phosphinothricinacetyltransferase-codierende *bar*-Gen enthält, wurde in einem molaren Verhältnis von 1:1 mit einem zu co-transformierenden Vektor gemischt. Insgesamt wurden dann 10 µl Plasmid-DNA-Lösung auf die Partikel von 25 µl einer 60 mg/l Goldsuspension präzipitiert. Für einen Beschuss wurden 30 µg Partikel in 5 µl Ethanol auf einen Makrocarrier aufgetragen. Der Beschuss erfolgte entsprechend den Herstellerangaben der DuPont PDS-1000/He.

Zwölf bis 16 Stunden nach dem Partikelbeschuss wurden die Explantate auf neues Kallusinduktions-Medium (wie für die Vorkultur der Embryonen) übertragen und 10 Tage bei 25°C im dunkeln inkubiert.

Die Kalli wurden danach auf Differenzierungsmedium übertragen (Basismedium nach Murashige and Skoog (1962) mit 20 g/l Saccharose, 5 µM CuSO₄, 0,25% Phytigel und 3 mg/l Bialaphos) und bei einer Photoperiode von 16h bei 200 µE und 25°C inkubiert.

30

- 29 -

Nach 2 Wochen erfolgte die Übertragung der nicht verbräunten Kalli auf Regenerationsmedium (Basismedium nach Murashige and Skoog (1962) mit 20 g/l Saccharose, 0,25% Phytigel und 4 mg/l Bialaphos) und eine weitere Inkubation bei einer Photoperiode von 16h bei 200 μ E und 25°C.

5

Nach weiteren 2 Wochen wurden die entstandenen Sprosse vereinzelt, in Kulturröhrchen mit Regenerationsmedium übertragen und bei einer Photoperiode von 16h bei 200 μ E und 25°C weiterkultiviert.

10 Die Identifizierung transgener Regenerate erfolgte per PAT-Aktivitätstest von Blattextrakten nach Spencer et al. (1990) bzw. durch Amplifizierung Transgen-spezifischer Sequenzen aus genomischer DNA der Kandidatenpflänzchen und/oder Southern Blot unter Verwendung einer entsprechenden Sonde.

15 Die Transformationseffizienz der Methode lag in Abhängigkeit von der Qualität des Ausgangsmaterials zwischen 0,5 bis 3 transgenen Pflanzen pro 100 kultivierten Embryonen.

4) *In situ* Oxalat-Oxidase-Aktivität in Pflanzen mit dem pPS24-Konstrukt
20 Blattsegmente von Bobwhite Wildtyppflanzen oder von pPS24-transgenen Weizenpflanzen der T3 Generation wurden unter Vakuum mit Oxalat-Oxidase-Nachweislösung (2.5 mM Oxalsäure, 3.5 mM freies EDTA, 0.6 mg/ml 4-Chlor-1-Naphthol, 50 μ g/ml Peroxidase aus Meeretich, 20% v/v Ethanol, mit Tris Base auf pH 4.0 eingestellt) infiltriert und über Nacht bei +37°C inkubiert. Nach Entfernen
25 der Nachweislösung wurden die Blätter für weitere 24 h bei +4°C in H₂O inkubiert. Danach wurden die Blätter von Hand mittels Skalpell in dünne Segmente quergeschnitten und mikroskopiert. Die Phasenkontrast-Lichtmikroskopie erfolgte mit einem Zeiss Axiophot bei 100-facher Vergrößerung. Zellen mit Oxalat Oxidase Expression besitzen violett gefärbte Zellwände.

30

5) Nachweis des TAPERO-Transgens in pPS41-transgenen Pflanzen durch Northern-Blot-Analyse

Blätter von Bobwhite und von pPS41-transgenen Pflanzen der T2 Generation (je ca. 1 g Frischgewicht, FG), beide im Fahnenblattstadium, wurden in flüssigen Stickstoff homogenisiert, bis feines Pulver entstand. Das Pulver wurde zu 3 ml RNA-Extraktionspuffer (0.5 M Tris-Cl pH 8.0; 0.25 M Na-EDTA; 5% (w/v) SDS) und 1,5 ml puffergesättigtem Phenol gegeben (15 ml Plastik-Röhrchen) und gut geschüttelt. Die Extrakte wurden für 30 min bei 4000 rpm-5000 rpm, 20°C zentrifugiert (swing out, Heraeus Varifuge). Es wurde 1,5 ml Chloroform zugegeben (ohne Überstand abzugießen) und das Röhrchen mehrere Male invertiert. Die Extrakte wurden für 30 min bei 4000 rpm-5000 rpm, 20°C rezentrifugiert und der Überstand vorsichtig in ein neues Röhrchen (15 ml Plastik-Röhrchen) gegossen. Die RNA wurde durch Zugabe von 3 ml 6 M LiCl gefällt (über Nacht, 4°C). Die gefällte RNA wurde für 30 min bei 12500 rpm, 4°C zentrifugiert (Festrotor, Hermle Z360K), die RNA-Pellets wurden in 500-1000 µl 70% Ethanol aufgenommen (RNA löst sich nicht) und in Eppendorf röhrchen überführt. Die Proben wurden für 10 min bei 14000 rpm, 4°C zentrifugiert (Festrotor, Eppendorf Centrifuge 5417R) und der Überstand abgehoben. Die RNA-Pellets wurden 5 min bei 37°C getrocknet, in 100 µl-200 µl TE aufgenommen und 5-10 min bei 75°C gelöst. Die denaturierende Agarose-Gelelektrophorese der RNA in formaldehydhaltigen Gelen und der Transfer auf Nylonmembranen (Hybond N, Amersham) erfolgte gemäss Standardprotokollen (Sambrook et al., vide supra). Pro Probe wurden 10 µg RNA aufgetragen.

Die radioaktive Sondenmarkierung mit α ^{32}P -dCTP erfolgte nach der Methode des „random prime labelling“ unter Verwendung eines Kits (Roche). Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 65°C in CHURCH Puffer (0,5 M NaPhosphat pH 7,2; 1 % (w/v) BSA; 7 % (w/v) SDS; 1 mM Na₂EDTA). Die Blots wurden 2 x 15 min in Waschlösung (0.1 x SSC; 0.1 % w/v SDS) bei 65°C gewaschen und anschließend für 16-48 h gegen Phosphorimager-Screens exponiert. Die exponierten Screens wurden mit einem Phosphorimagergerät (FujiFilm FLA 3000) eingescannt und als Bilddateien im TIFF Format exportiert.

6) Nachweis des TAPERO-Transgens in pPS41-transgenen Pflanzen durch Western-Blot-Analyse

Blattspitzen von Bobwhite und von pPS41-transgenen Pflanzen der T2 Generation, beide im Fahnenblattstadium, wurden in IWF Puffer (32 mM Na-Phosphat; 84 mM Citrat; pH 2.8; Spatelspitze Polyvinylpolypyrrolidon) homogenisiert. Die Homogenate wurden für 15 min bei 13.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Die Überstände wurden mit 0.5 g/ml Ammoniumacetat versetzt und säurelösliche Proteine über Nacht bei 4°C gefällt. Die Proteine wurden für 30 min bei 13.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Die Proteinpellets wurden in 50 µl/g FG Resuspensionspuffer (50 mM Tris-Cl pH 7.5; 20 % (v/v) Glycerin) aufgenommen. Zu 20 µl Probe wurden 5 µl 4-fach konzentrierter SDS Probenpuffer zugegeben, und die Proben wurden mit soviel (1-5 µl) gesättigter Tris-Lösung versetzt, bis der Farbumschlag des Bromphenolblaus zu Blau stattfand. Pro Spur wurden 12,5 µl gekochte Probe in denaturierender SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (15%iges Trenngel) nach einer Standardmethode unter Verwendung von Minigelapparaturen der Firma Bio-Rad aufgetrennt. Nach der Elektrophorese wurden die Gele entweder Coomassie gefärbt (als Beladungskontrolle) oder nach einer Standardmethode auf eine Nitrozellulosemembran übertragen (geblottet). Die Membranen wurden nach einer Standardmethode mit einem ersten, polyklonalen Antikörper (Verdünnung 1:2000), gerichtet gegen das Prx8 Protein aus Gerste (ein homologes Protein zu TAPERO), inkubiert, gefolgt vom zweiten Antikörper (Verdünnung 1:2000), der gegen Kaninchen-Antikörper gerichtet und an den alkalische Phosphatase gekoppelt war. Die TAPERO Proteinbanden wurden durch lokalisierte alkalische Phosphataseaktivität (BCIP/NBT Färbelösungen; Fertigtabletten (Roche)) nachgewiesen.

7) Nachweis der epidermisspezifischen Transgenexpression durch Northern-Blot-Analyse und Real-Time-PCR-Analyse

Die RNA-Extraktion und die Northern-Blot-Analyse wurden durchgeführt wie in Beispiel 5 beschrieben. Die Real-Time-PCR-Analyse erfolgte mit einem LightCycler®-Gerät (Roche, Mannheim, Deutschland) nach Herstellerangaben.

5

8) Mehltaresistenz in pPS41- bzw. pWIR5-TaMlo-RNAi-transgenen Pflanzen
Für den Resistenztest wurden adulte, im Gewächshaus angezogene pPS41- oder pWIR5-TaMlo-RNAi-transgene Weizenpflanzen mit voll entwickeltem, frisch geschobenem Fahnenblatt verwendet. Als Kontrollen dienten gleichzeitig

10 angezogene Wildtyp-Pflanzen

cv. Bobwhite. Die apikale Hälfte des Fahnenblattes wurde abgeschnitten und auf 0,5% (w/v) Phytoagar, der mit 20 ppm Benzimidazol versetzt war, in 20 x 20 cm großen Polycarbonat-Schalen aufgelegt. Pro Schale wurde eine transgene Sublinie (je 20 Blätter) plus Bobwhite Wildtyp (je 6 Blätter) aufgelegt. Die Blattsegmente
15 wurden in einem Inokulationsturm mit Mehltasporen inokuliert, indem Sporen von 4 stark inokulierten Weizenblättern in den Turm eingeblasen wurden. Nach 5 min wurden die Schalen entfernt, geschlossen und bei 20°C und indirektem Tageslicht inkubiert. Sieben Tage nach Inokulation wurde der Mehltaubefall bonitiert unter Verwendung eines Klassenbonitursystems (Schweizer et al., 1995). Die Resistenz
20 wurde bezogen auf die sich auf der jeweiligen Phytoagarplatte befindlichen Kontrollblätter berechnet.

Literatur:

- Christensen and Quail (1996) Transgenic Res. 5: 213-218.
- 5 Elliott *et al.*, (2002). Molecular Plant Microbe Interactions 15: 1069-1077.
- Murashige and Skoog (1962) Physiologia Plantarum 15: 473-497.
- 10 Schweizer, P., Vallélian-Bindschedler, L., and Mössinger, E. (1995). Heat-induced resistance in barley to the powdery mildew fungus *Erysiphe graminis* f.sp. *hordei*, Physiological and Molecular Plant Pathology 47, 51-66.
- 15 Schweizer, P., Pokorny, J., Abderhalden, O., and Dudler, R. (1999). A transient assay system for the functional assessment of defense-related genes in wheat, Mol Plant-Microbe Interact 12, 647-654.
- Spencer et al. (1990) TAG 79: 625-631.

- 34 -

ANSPRÜCHE

1. Promotorregion mit Spezifität für die pflanzliche Epidermis,
5 umfassend eine erste, aus dem Promotor des Gens GSTA1 stammende Sequenz, und
eine zweite, aus dem Intron des Gens WIR1a stammende Sequenz.
2. Promotorregion nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei der ersten Sequenz um SEQ ID Nr. 1 und
10 bei der zweiten Sequenz um SEQ ID Nr. 2 handelt.
3. Promotorregion nach Anspruch 1 oder 2,
dadurch gekennzeichnet, dass sie ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus
 - a) Promotorregionen, die die unter SEQ ID Nr. 3 angegebene
15 Nukleinsäuresequenz umfassen,
 - b) Promotorregionen, die einen funktionalen Teil der unter SEQ ID Nr. 3
angegebenen Nukleinsäuresequenz umfassen, und
 - c) Promotorregionen, die eine Sequenz aufweisen, die unter stringenten
Bedingungen mit der unter SEQ ID Nr. 3 angegebenen
20 Nukleinsäuresequenz hybridisiert.
4. Chimäres Gen,
dadurch gekennzeichnet, dass es eine Promotorregion nach einem der Ansprüche 1
bis 3 in operativer Verknüpfung mit einer kodierenden Sequenz enthält.
25
5. Chimäres Gen nach Anspruch 4,
dadurch gekennzeichnet, dass seine Expression zu einem erhöhten Gehalt des von
der kodierenden Sequenz kodierten Proteins in der Epidermis führt.

- 35 -

6. Chimäres Gen nach Anspruch 4 oder 5,
dadurch gekennzeichnet, dass die kodierende Sequenz aus einem Resistenzgen stammt.
- 5 7. Chimäres Gen oder rekombinantes Nukleinsäuremolekül nach Anspruch 5 oder 6,
dadurch gekennzeichnet, dass die kodierende Sequenz für eine Peroxidase oder eine Oxalat-Oxidase kodiert.
- 10 8. Chimäres Gen nach Anspruch 4,
dadurch gekennzeichnet, dass seine Expression die Expression des entsprechenden endogenen Gens in der Epidermis unterdrückt.
9. Chimäres Gen nach Anspruch 8,
15 **dadurch gekennzeichnet**, dass die kodierende Sequenz in antisense-Orientierung vorliegt.
10. Chimäres Gen nach Anspruch 8,
dadurch gekennzeichnet, dass die Unterdrückung der Expression des endogenen
20 Gens durch RNA-Interferenz erfolgt.
11. Chimäres Gen nach einem der Ansprüche 8 bis 10,
dadurch gekennzeichnet, dass das endogene Gen, dessen Expression unterdrückt wird, das Mlo-Gen ist.
- 25 12. Rekombinantes Nukleinsäuremolekül, umfassend eine Promotorregion nach einem der Ansprüche 1 bis 3 oder ein chimäres Gen nach einem der Ansprüche 4 bis 11.

- 36 -

13. Rekombinantes Nukleinsäuremolekül nach Anspruch 12, zusätzlich umfassend transkriptionelle Terminationsequenzen.

14. Verfahren zur Herstellung transgener Pflanzen mit
5 epidermisspezifischer Expression eines Transgens, umfassend die Schritte:
- a) Herstellung eines rekombinanten Nukleinsäuremoleküls nach Anspruch 12 oder 13,
 - b) Übertragung des rekombinanten Nukleinsäuremoleküls aus a) auf pflanzliche Zellen und
 - 10 c) Regeneration vollständig transformierter Pflanzen und, falls erwünscht, Vermehrung der Pflanzen

15. Transgene Pflanzen, enthaltend ein rekombinantes Nukleinsäuremolekül nach Anspruch 12 oder 13 oder hergestellt nach einem
15 Verfahren nach Anspruch 14, sowie transgene Teile dieser Pflanzen und deren transgenes Vermehrungsmaterial, wie Protoplasten, Pflanzenzellen, Kalli, Samen, Knollen oder Stecklinge, sowie die transgenen Nachkommen dieser Pflanze.

16. Transgene Pflanzen nach Anspruch 15, bei denen es sich um
20 monokotyledone Pflanzen handelt.

17. Transgene Pflanzen nach Anspruch 16, bei denen es sich um Poaceen handelt.

25 18. Transgene Pflanzen nach Anspruch 17, bei denen es sich um Weizen oder Gerste handelt.

19. Verwendung einer Promotorregion nach einem der Ansprüche 1 bis 3 zur epidermisspezifischen Expression von Transgenen in Pflanzen.

- 37 -

20. Verwendung nach Anspruch 19, wobei das Transgen ein Resistenzgen ist.

21. Verfahren zur Erhöhung der Pathogenresistenz in transgenen Pflanzen, umfassend die Schritte:

- a) Herstellung eines rekombinanten Nukleinsäuremoleküls nach Anspruch 12 oder 13,
- b) Übertragung des rekombinanten Nukleinsäuremoleküls aus a) auf pflanzliche Zellen und
- 10 c) Regeneration vollständig transformierter Pflanzen und, falls erwünscht, Vermehrung der Pflanzen.

22. Transgene Pflanzen mit erhöhter Pathogenresistenz, enthaltend ein rekombinantes Nukleinsäuremolekül nach einem der Ansprüche 12 bis 13 oder
15 hergestellt nach einem Verfahren nach Anspruch 21, sowie transgene Teile dieser Pflanzen und deren transgenes Vermehrungsmaterial, wie Protoplasten, Pflanzenzellen, Kalli, Samen, Knollen oder Stecklinge, sowie die transgenen Nachkommen dieser Pflanze.

20 23. Transgene Pflanzen nach Anspruch 22, bei denen es sich um monokotyledone Pflanzen handelt.

24. Transgene Pflanzen nach Anspruch 23, bei denen es sich um Poaceen handelt.

25

25. Transgene Pflanzen nach Anspruch 24, bei denen es sich um Weizen oder Gerste handelt.

- 38 -

26. Transgene Pflanzen nach einem der Ansprüche 22 bis 25,
dadurch gekennzeichnet, dass sie eine erhöhte Resistenz gegen Echten Mehltau
zeigen.

Abbildung 1:

GstA1 Promotor

GACGCCGAAGTGGAGCCGACAGCCCCCAGGTCCCAAGCCCTCGGCAGACTAGATCACTAGCCCTGGATCGGCGAGGTGAC
TGGATGACGAGCAGCACCTGGTCTGGCGGGTGTGGGCGAGTAGAACCAGGGGCGATGGCGACGCGCTGACCTTCTCCCC
TCACCGGCGATCTGCTCCTTCTGGGTGGGGGTGCGCGGCTGACGTTCTGTTGCGGGGTGGGGTTCGCCGGCTGGCGTTCT
GCTGCGGGGTGGGAGTCGCCGACCGGCGTGCTGCTGCTAGGACAATCGGTGAGGCCAGTTAGGTGCTAGCCGATCGATTG
GCGAAGAGATCCGAGTCCTGGGGAGATCAGTGAGGCCAGGTGCTATTTGGCCTATCAATTGGCCAGGTCTGGGAACGGG
GCGTGGCGTGATCAACGAGGTGCTAGGCTGCTAGCTAGGGAACCTGGATCCTGGAACGTGGAGGAGGCAAGTCCGGTATGC
TAAGTACTTTAACTTTCCTTCTTCACATCCACCTGATTGAGATTATTTTGATCTAAATTAACCTGCAAAAAATATATGTG
TGATATCCATCTACTATAATTGCTTACAATCAAAATTATATGTGATTTTTTTTAGTTTAGAAGATTTATATGCACAGTAA
ATCTGAATGTTCTTCACATGCATGATTTAGTTTAACTTTAAAGAGTTATACTAACTAGTCTTGATAAAGAGATCTTTTGG
AGCAACACCAAACCTCGTGAGGTGTTTTGCCTACGGAAAGGTGTGCTATGTAATGATTATTATTAGGATCAAAGTTGTA
GGATAAACGTAAACCTTCTCGATGTATCTTTTATACAACATTGTAGTTTAGTTATATATGGAGAGAGTGATTTAACACT
TTGTGTTTAAAGAGTAGAATAAGTTATTCCACACTCTAGCCAAACGAACTATTTGGCAAATATCTCGCTAGCTGGTGAGAG
CCAGAGCCGTGGAAAGTCTGTCTTGCTATTAAGGCACAAGCATCAAACAGGAACATTTAGAGCCATGGAAAAGTGATGTG
TCGCCTACCAATGGGCCAACTGCTAGCGATGTAATAATAGCATCCAAGTTGATTTTTTTATAGAACATGCAAGGCGTTGGC
AAGTGGGAAAATGATTGATCGCTGGCAAGCTTAACTCTCGGAACCTATAGCATTCAACTGAATCAGAACAAGATTAATA
AAAAATACATTTCCATCGATAGTGAAAAATTATTCAATTGAGTGACAACGAAATCATATTGGAATGTACATTTACTTGT
TGATTTTAAATTAGAGGCATTTTTCTACCTTTTTTAGTTAATAAGATATGCATATACCCACCCTTAGTGTTTTTCGAGACA
ACGAGAGGGCACATTGCTTTTGGTGCTACCATCTCTCAAGCCTCAAATAAGTTGTGCGGACACGATTATCTTCCCGCG
TTGGAATATCGTGGCCTGGTAGAGCTAGCGAAAAATCTTCCATGTTGGAATATGTCGGCAGCCGGATAGCCGCCATGCAT
GTAAAGTCTCTTTTACCTTTACACTTGCTCAAGTGACACTGTATGTGCGCTACCACTTGCTAAATCAATGGGCCAACTGC
TAGCGACGTAATAGTAGCAAGTTGATTTACAGTGTTTTGCTACAGTTCTCTGACTTTGTTTCTTCATTTTAGACTAGCTG
ACTACTGTCGCTTACCTGCCTTCCCTTCTCCACGTTAGAGGATCCAGTTCTGATATTGAGACCTCGACGATGGGAGGAAG
GGCGCGATCGATGTGGAGTAATTTGAATTTCAAATCTATCTATCTGGGGTATATTGGTCCTTCACCGATGTTTGGGGGGC
TGTCGGAAATTGGTTCCGCGATCTACAAAAGTGAATGGAGGGAGTAGTTGTTTCTCCAATCCGTACCAACGCACGTGTTT
CTAACTAGTACTTACTTCCCTTCGCACCACAATATGGAATAGAGGGAGTATCGATAAACTAACAAAGATGATTACTTACCC
GGTTTAAATGATTCAAGAGCTCATTTAATTTGGCACTCATCATTTTCATATATCTTTTTTGGTAGAAATGAAATAAAGCAG
ATCTAGACACTAGCTAAAAAGTCGATGTAGCCTTGTTATTTCTTGGGCCACGCGGGCCGGGTGTGGTGCTCCCTGCTCT
GTGTATAAATGGAGATCAACATCCAAGGCCTCCTCCCA

Abbildung 2:

WIR1A Intron:

GTCAGTCGTCGGACGGTGTCCGTTCAATTCCTCCCCATTTTGTAAATTGATTAACCTTGTTATACATGCTGACCTCGACCTGCT
GAATAACGTCCGTCCATGGTTTCCCGTCCAGGCACC

Abbildung 3:

GstA1 Promotor mit WIR1a Exon/Intron:

GACGCCGAAGTGGAGCCGACAGCCCCAGGTCCCAAGCCCTCGGCAGACTAGATCACTAGCCCTGGATCGGCGAGGTGAC
TGGATGACGAGCAGCACCTGGTCTGGCGGGTGTGGGCGAGTAGAACCAGGGGCGATGGCGACGCGCTGACCTTCTCCCC
TCACCGGCGATCTGCTCCTTCTGGGTGGGGGTCGCCGGCTGACGTTCTGTTGCGGGGTGGGGGTCGCCGGCTGGCGTTCT
GCTGCGGGGTGGGAGTCGCCGACCGGCGTGCTGCTGCTAGGACAATCGGTGAGGCCAGTTAGGTGCTAGCCGATCGATTG
GCGAAGAGATCCGAGTCCTGGGGAGATCAGTGAGGCCAGGTGCTATTTGGCCTATCAATTGGCCAGGTTCTGGGAACGGG
GCGTGGCGTGATCAACGAGGTGCTAGGCTGCTAGCTAGGGAAGTGGATCCTGGAACGTGGAGGAGGCAAGTCCGGTATGC
TAAGTACTTTAACTTTCCTTCTTCACATCCACCTGATTGAGATTATTTTGATCTAAATTAACCTTGCAAAAAATATATGTG
TGATATCCATCTACTATAATTGCTTACAATCAAAATTATATGTGATTTTTTTTAGTTTAGAAGATTTATATGCACAGTAA
ATCTGAATGTTCTTCACATGCATGATTTAGTTTAACTTTAAAGAGTTATACTAACTAGTCTTGATAAAGAGATCTTTTGG
AGCAACACCAAACCTCGTGAGGTGTTTTGCCTACGGAAAGGTTGTGCTATGTAATGATTATTATTAGGATCAAAGTTGTA
GGATAAACGTAAACCTTCTCGATGTATCTTTTATACAACATTGTAGTTTAGTTATATATGGAGAGAGTGATTTAACACT
TTGTGTTTAAAGAGTAGAATAAGTTATTCCACACTCTAGCCAAACGAACTATTTGGCAAATATCTCGCTAGCTGGTGAGAG
CCAGAGCCGTGGAAAGTCTGTCTTGCTATTAAGGCACAAGCATCAAACAGGAACATTTAGAGCCATGGAAAAGTGATGTG
TCGCCTACCAATGGGCCAACTGCTAGCGATGTAATAATAGCATCCAAGTTGATTTTTTATAGAACATGCAAGGCGTTGGC
AAGTGGGAAAATGATTGATCGCTGGCAAGCTTAACTCTCGGAACCTTATAGCATTCAACTGAATCAGAACAAGATTAAAA
AAAAATACATTTCCATCGATAGTGAAAAATTATTCAATTGAGTGACAACGAAAATCATATTGGAATGTACATTTACTTGT
TGATTTTAAATTAGAGGCATTTTTCTACCTTTTTTAGTTAATAAGATATGCATATACCCACCCTTAGTGTTTTCGAGACA
ACGAGAGGGCACATTGCTTTTGGTGCTACCATCTCTCTCAAGCCTCAAATAAGTTGTGCGGACACGATTATCTTCCGCG
TTGGAATATCGTGGCCTGGTAGAGCTAGCGAAAAATCTTCCATGTTGGAATATGTGCGGACGCCGATAGCCGCCATGCAT
GTAAAGTCTCTTTTACCTTTACACTTGCTCAAGTGACACTGTATGTCGCCTACCACTTGCTAAATCAATGGGCCAACTGC
TAGCGACGTAATAGTAGCAAGTTGATTTACAGTGTTTTGCTACAGTTCTCTGACTTGTTTCTTCATTTTAGACTAGCTG
ACTACTGTCGCTTACCTGCCTTCCCTTCTCCACGTTAGAGGATCCAGTTCTGATATTGAGACCTCGACGATGGGAGGAAG
GGCGCGATCGATGTGGAGTAATTTGAATTTCAAATCTATCTATCTGGGGTATATTGGTCCTTCACCGATGTTTGGGGGGC
TGTCGGAAATTGGTTCCGCGATCTACAAAAGTGAATGGAGGGAGTAGTTGTTTCTCCAATCCGTACCAACGCACGTGTTT
CTAACTAGTACTTACTTCCTTCGCACCACAATATGGAATAGAGGGAGTATCGATAAACTAACAAAGATGATTACTTACCC
GGTTTAAATGATTCAAGAGCTCATTTAATTTGGCACTCATCATTTTATATATCTTTTTTGGTAGAAATGAAATAAAGCAG
ATCTAGACACTAGCTAAAAAGTCGATGTAGCCTTGTTATTTCTTGGGCCACGCGGGCCGGGTGTGGTGCTCCCTGCTCT
GTGTATAAATGGAGATCAACATCCAAGGCCTCCTCCCACACACACGCTACAGAGCAGAGCAGAGTCTTGCTCCAGTAT
CTGCCCTCTCCTGCCTGCCTGTAGAGCATCCATCACGTGAAGTTCACGGACAACTACGTACACAGGCAGCTAGCTCTCG
AAACCTCGCTCGAAACGCACCTGCAGATCGCTCTCTCGTCGTCGTCGCGCGATCATCATCAACAGCTCCGTCTGCCTT
GGAGCCACGGCCGTCCACGACGCCGCCCTCAGGTGAGTCGTCGGACGGTGTCCGTTTCAATTTCTCCCCATTTTGTAA
TTGATTAACCTGTTATACATGCTGACCTCGACCTGCTGAATAACGTCCGTCCATGGTTTTCCCGTCCAGGCACC

Abbildung 4:

TAPERO cDNA:

ACCACCACACCACTCCACCAGTAAGAAGTGCAGCAGGTAGCTAGTAAGCCGGCGTAGCTTTGCTCTTGCAGCTAGCTAGC
TAACCATGGCCGCCTCTGCCTCTTGCCCTTCTCTTGTGGTGCTCGTGGCTCTGGCCACGGCGGCGTGGCGCAGCTGTCA
CCGACCTTCTACGACACGTCCTGCCCCAGGGCCCTGGCCATCATCAAGAGTGGCGTCATGGCCGCCGTGAGCAGCGACCC
TCGGATGGGCGCGTCGCTGCTCCGGCTGCACTTCCACGACTGCTTCGTCCAAGGCTGCGACGCGTCTGTTTTGCTGTCTG
GCATGGAACAAAATGCTATCCCGAACGCGGGGTGCTGAGGGGCTTCGGCGTCATCGACAGCATCAAGACGCAGATCGAG
GCCATCTGCAATCAGACCGTCTCCTGCGCCGACATCCTCACCGTCGCCGCCCGTGACTCCGTTGTAGCCCTCGGAGGGCC
GTCATGGACAGTCCCTCTGGGGAGAAGAGATTCCACAGATGCAAACGAGGCGGCGGCAAACAGCGACCTGCCAGGCTTTA
CATCTAGCCGGTCAGATCTTGAGCTGGCATTCAGAAACAAGGGCCTCCTTACGATCGACATGGTGGCCCTCTCGGGCGCG
CACACCATCGGCCAGGCGCAGTGTGGGACCTTTAAGGACAGGATCTACAATGAGACTAACATCGACACGGCCTTCGCCAC
ATCTCTCCGGGCCAACTGCCCCAGGTCAAACGGCGACGGGAGCCTGGCGAACCTGGACACGACGACGGCCAACACGTTCTG
ATAACGCCTACTACACCAACCTCATGTACAGAAGGGGCTCCTGCACTCGGACCAGGTGCTGTTCAACAACGACACCACC
GACAACACTGTCCGGAACCTTTGCGTCGAACCCAGCGGCGTTCAGCAGCGCCTTCACGACCGCCATGATCAAGATGGGCAA
CATCGCGCCGAAGACAGGCACGCAGGGGCAGATCAGGCTCAGCTGCTCCAGGGTGAACTCGTGATTGATAGACGAGTTAC
TGCATACTAGCCAGCACGACACGTACGTGAATGAATAAGGCCACAGAACCAGTGGCCAATATAAATACCAGCTCTTGAAA
CCGTGTATTTTATGTACGAGTAGCAGCAAATCATGCATGCATCTACACATATATATGTAACGATCGAATTCCCACTTTCT
CATGCAAAGGCATGGAGAATTACTATCAATCTTAGTTATACGTGTA

Abbildung 5a:

Eigenschaften von pPS41:

Gesamtlänge:	7011 bp
vector Backbone: pBluescript SK+, ganzes Konstrukt zwischen XhoI und SacI	
Schnittstellen.	
GstA1 Promoter:	694-2891
Transcription start:	2892
GstA1 5' UTR	2892-2988
WIR1 5' UTR (part)	2989-3034
WIR1 part of 5' CDS + Intron	3035-3246
TAPERO cDNA	3264-4509
ATG TAPERO	3348
Stop codon:	4284
Poly(A)	4510-4514
CamV 35S Terminator:	4576-4776

CTAAATTGTAAGCGTTAATATTTTGTAAATTCGCGTTAAATTTTGTAAATCAGCTCATTTTTTAACCAATAGGCCG
AAATCGGCAAAATCCCTTATAAATCAAAGAATAGACCGAGATAGGGTTGAGTGTGTTCCAGTTTGGAACAAGAGTCCA
CTATTAAAGAACGTGGACTCCAACGTCAAAGGGCGAAAAACCGTCTATCAGGGCGATGGCCCACTACGTGAACCATCACC
CTAATCAAGTTTTTTGGGGTCGAGGTGCCGTAAAGCACTAAATCGGAACCCTAAAGGGAGCCCCGATTTAGAGCTTGAC
GGGGAAGCCGGCGAACGTGGCGAGAAAGGAAGGGAAGAAAGCGAAAGGAGCGGGCGCTAGGGCGCTGGCAAGTGTAGCG
GTCACGCTGCGCGTAACCACACACCCGCGCGCTTAATGCGCCGCTACAGGGCGCGTCCCATTGCGCCATTCAGGCTGCG
CAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCCTCTTCGCTATTACGCCAGCTGGCGAAAGGGGGATGTGCTGCAAGGCGAT
TAAGTTGGGTAAACGCCAGGGTTTTCCAGTCACGACGTTGTAAACGACGGCCAGTGAGCGCGCGTAATACGACTCACTA
TAGGGCGAATTGGGTACCGGGCCCCCTCGAGTCTAGAACTAGTGGATCCCCGACGCCGAAGTGGAGCCGACAGCCCCC
AGGTCCCAAGCCCTCGGCAGACTAGATCACTAGCCCTGGATCGGCGAGGTGACTGGATGACGAGCAGCACCTGGTCTGGC
GGGTGTTGGGCGAGTAGAACCAGGGGCGATGGCGACGCGCTGACCTTCTCCCTCACCGGCGATCTGCTCCTTCTGGGTG
GGGTGCGCCGCTGACGTTCTGTTGCGGGGTGGGGGTGCGCCGCTGGCGTTCTGCTGCGGGGTGGGAGTCGCCGACCGGC
GTGCTGCTGCTAGGACAATCGGTGAGGCCAGTTAGGTGCTAGCCGATCGATTGGCGAAGAGATCCGAGTCTTGGGGAGAT
CAGTGAGGCCAGGTGCTATTGCGCTATCAATTGGCCAGGTTCTGGGAACGGGGCGTGGCGTGATCAACGAGGTGCTAGG
CTGCTAGCTAGGGAACCTGGATCCTGGAACGTGGAGGAGGCAAGTCCGGTATGCTAAGTACTTTAACTTCTCCTTCTTACA
TCCACCTGATTGAGATTATTTGATCTAAATTAACCTTGCAAAAAATATATGTGTGATATCCATCTACTATAATTGCTTAC
AATCAAAATTATATGTGATTTTTTTTAGTTTAGAAGATTTATATGCACAGTAAATCTGAATGTTCTTCACATGCATGATT
TAGTTTAACTTTAAAGAGTTATACTAAGTCTTGATAAAGAGATCTTTTGGAGCAACACCAAACCTCGTGAGGTGTTT
TGCTTACGGAAAGGTTGTGCTATGTAATGATTATTATTAGGATCAAAGTTGTAGGATAAACGTAACCTTCTCGATGTA
TCTTTTATACAACATTGTAGTTTAGTTATATATGGAGAGAGTGATTAACTTTGTGTTTAAAGAGTAGAATAAGTTATT
CCACACTCTAGCCAAACGAACATTTTGGCAATATCTCGCTAGCTGGTGAGAGCCAGAGCCGTGGAAAGTCTGTCTTGCT
ATTAAGGCACAAGCATCAAACAGGAACATTTAGAGCCATGGAAAAGTGATGTGTGCGCTACCAATGGGCCAACTGCTAGC
GATGTAATAATAGCATCCAAGTTGATTTTTTATAGAACATGCAAGGCGTTGGCAAGTGGGAAATGATTGATCGCTGGCA
AGCTTAACTCTCGGAACCTATAGCATTCAACTGAATCAGAACAAAGATTAAAAAAAATACATTTCCATCGATAGTGAAA
AATTATTCAATTGAGTGACAACGAAATCATATTGGAATGTACATTTACTTGTGATTTTAAATTAGAGGCATTTTTCTA
CCTTTTTTAGTTAATAAGATATGCATATACCCACCCTTAGTGTTCGAGACAACGAGAGGGCACATTGCTTTTGGTGCT
ACCATCTCTCTCAAGCCTCAAATAAGTTGTGCGGACACGATTATCTTCCCGCGTTGGAATATCGTGGCCTGGTAGAGCTA
GCGAAAAATCTTCCATGTTGGAATATGTGCGGACGCCGATAGCCGCCATGCATGTAAAGTCTCTTTTACCTTTACACTTG
CTCAAGTGACACTGTATGTGCGCTACCACTTGCTAAATCAATGGGCCAACTGCTAGCGACGTAATAGTAGCAAGTTGATT
TACAGTGTTTTGCTACAGTCTCTGACTTTGTTTCTTCATTTTAGACTAGCTGACTACTGTGCTTACCTGCCTTCCCTT
CTCCACGTTAGAGGATCCAGTTCTGATATTGAGACCTCGACGATGGGAGGAAGGGCGCGATCGATGTGGAGTAATTTGAA
TTTCAAATCTATCTATCTGGGGTATATTGGTCTTCCACGATGTTTGGGGGGCTGTGCGAAATTGGTTCCGCGATCTACA
AAAGTGAATGGAGGGAGTAGTTGTTTCTCAATCCGTACCAACGCACGTGTTTCTAACTAGTACTTACTTCTTTCGCACC
ACAATATGGAATAGAGGGAGTATCGATAAACTAACAAAGATGATTACTTACCCGGTTTAAATGATTCAAGAGCTCATTTA
ATTTGGCACTCATCATTTTCATATATCTTTTTTGGTAGAAATGAAATAAAGCAGATCTAGACACTAGCTAAAAAGTCGATG
TAGCCTTGTTATTTCCTTGGGCCACGCGGGCCGGGTGTGGTGCTCCCTGCTCTGTGTATAAATGGAGATCAACATCCAAG
GCCTCCTCCACACACACAGCTACAGAGCAGAGCAGAGTCTTGCTCCAGTATCTGCCCTCTCCTGCCTGCCTGTAGAGC
ATCCATCACGTGAAGTTCACGGACAACTACGTACACAGGCAGCTAGCTCTCGAAACCTCGCTCGAAACGCACCTGCAGA
TCGCTCTCTTCGTCGTCGTCGCGCGATCATCATCAACAGCTCCGTCTGCCCTTGGAGCCACGGCCGTCCACGACGCCGCC
GCCTCAGGTGAGTCGTCGCGACGGTGTCCGTTCAATTTCTCCCATTTTTGTAATTGATTAACTTGTATACATGCTGACC
TCGACCTGCTGAATAACGTCCGTCCATGGTTTCCCGTCCAGGCACCCGGGCTGCAGGAATTCACCACCACACCACTCCA
CCAGTAAGAAGTGCAGCAGGTAGCTAGTAAGCCGGCGTAGCTTTGCTCTTGACGCTAGCTAGCTAACCATGGCCGCCCTCT
GCCTCTTGCTTTCTCTTGTGGTGCTCGTGGCTCTGGCCACGGCGGCGTGGCGCAGCTGTACCGACCTTCTACGACAC
GTCCTGCCCCAGGGCCCTGGCCATCATCAAGAGTGGCGTCATGGCCGCCGTGAGCAGCGACCTCGGATGGGCGCGTCCG
TGCTCCGGCTGCACTTCCACGACTGCTTCGTCCAAGGCTGCGACGCGTCTGTTTGTGTCTGGCATGGAACAAAATGCT
ATCCCGAACGCGGGGTGCTGAGGGGCTTCGGCGTCATCGACAGCATCAAGACGCGAGATCGAGGCCATCTGCAATCAGAC
CGTCTCCTGCGCCGACATCCTCACCGTCGCGGCCCGTGAATCCGTTGTAGCCCTCGGAGGGCCGTGATGGACAGTCCCTC
TGGGGAGAAGAGATTCCACAGATGCAACGAGGCGGCGGCAACAGCGACCTGCCAGGCTTTACATCTAGCCGGTCAAGT
CTTGAGCTGGCATTCAGAAACAAGGGCCTCCTTACGATCGACATGGTGGCCCTCTCGGGCGCGCACACCATCGGCCAGGC
GCAGTGTGGGACCTTTAAGGACAGGATCTACAATGAGACTAACATCGACACGGCCTTCGCCACATCTCTCCGGGCCAACT

GGCCAGGTCAAACGGCGACGGGAGCCTGGCGAACCTGGACACGACGACGGCCAACACGTTGATAACGCCTACTACACC
AACCTCATGTACAGAAGGGGCTCCTGCACTCGGACCAGGTGCTGTTCAACAACGACACCACCGACAACACTGTCCGGAA
CTTTGCGTCGAACCCAGCGGCGTTCAGCAGCGCCTTCACGACCGCCATGATCAAGATGGGCAACATCGCGCCGAAGACAG
GCACGCAGGGGCAGATCAGGCTCAGCTGCTCCAGGGTGAACCTGATGATAGACGAGTTACTGCATACTAGCCAGCAC
GACACGTACGTGAATGAATAAGGCCACAGAACCAGTGGCCAATATAAATACCAGCTCTTGAAACCGTGTATTTTATGTAC
GAGTAGCAGCAAATCATGCATGCATCTACACATATATATGTAACGATCGAATTCCCACCTTCTCATGCAAAGGCATGGAG
AATTACTATCAATCTTAGTTATACGTGTATAAAAAGCGGCCGCGAATTCGATATCAAGCTTATCGATACCGTCGACCTCG
ACCTGCAGGCATGCCCCGCTGAAATCACCAGTCTCTCTCTACAAATCTATCTCTCTATAAATAATGTGTGAGTAGTCCC
AGATAAGGGAATTAGGGTTCTTATAGGGTTTCGCTCATGTGTTGAGCATATAAGAAACCCCTTAGTATGTATTTGTATTTG
TAAATACTTCTATCAATAAAATTTCTAATTCCTAAAACCAAATCCAGGGGTACCGAGCTCGAATTCTAGTCTACGCGG
CCGCGAGCTCCAGCTTTTGTTCCTTTAGTGAGGGTTAATTGCGCGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCTGTG
TGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGT
GAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAA
TCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGCCTATTGGGCGCTCTTCGCTTCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTC
GTTCCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAA
GAACATGTGAGCAAAGGCCAGCAAAGGCCAGGAACCGTAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCC
CCCCTGACGAGCATCAAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTT
CCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCTGTTCCGACCCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGG
AAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTGCTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGC
ACGAACCCCCCGTTTCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACCTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTA
TCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTG
GCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTG
GTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTGTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAA
AAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACTCACGTTAAGGGATTTT
GGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTAAAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATAT
ATGAGTAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTTCATCC
ATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACC
GCGAGACCCACGCTCACC GGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCCTG
CAACTTTATCCGCCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTTCGCCAGTTAATAGTTTTCGCGC
AACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCTGTTGGTATGGCTTCATTACGCTCCGGTTCCCAACG
ATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCTCCGATCGTTGTCAGAAGTA
AGTTGGCCGAGTGTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTGATGCCATCCGTAAGATGCTTT
TCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGGCCGGCGTCAAT
ACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAGTGCTCATCATTGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACTCTCAA
GGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGACCCCACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTTACC
AGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACT
CATACTCTTCCTTTTCAATATTATTGAAGCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTT
AGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCAC

Fortsetzung Abbildung 5a

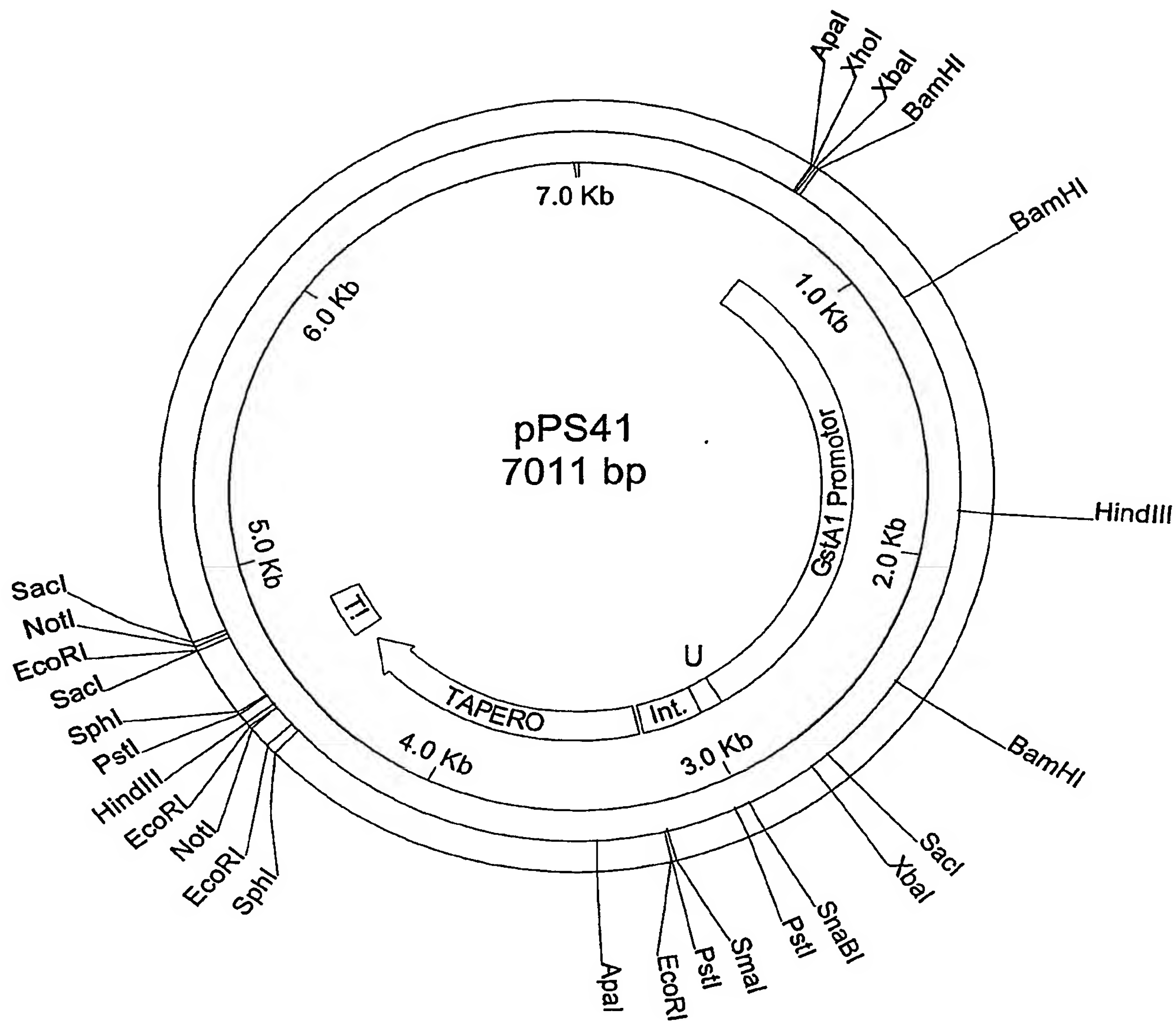


Abbildung 5b

Abbildung 6:

Germin 9f-2.8:

AGCTTATTACATAGCAAGCATGGGGTACTCCAAAACCCTAGTAGCTGGCCTGTTGCAATGCTGTTACTAGCTCCGGCCG
TCTTGGCCACCGACCCAGACCCTCTCCAGGACTTCTGTGTCGCCGACCTCGACGGCAAGGCGGTCTCGGTGAACGGGCAC
ACGTGCAAGCCCATGTGCGGAGGCCGGCGACGACTTCCTCTTCTCGTCCAAGTTGGCCAAGGCCGGCAACACGTCCACCCC
GAACGGCTCCGCCGTGACGGAGCTCGACGTGGCCGAGTGGCCCCGGTACCAACACGCTGGGTGTGTCCATGAACCGCGTGG
ACTTTGCTCCCGGAGGCACCAACCCACCACACATCCACCCGCGTGCCACCGAGATCGGCATCGTGATGAAAGGTGAGCTT
CTCGTGGGAATCCTTGGCAGCCTCGACTCCGGGAACAAGCTCTACTCGAGGGTGGTGCGCGCCGGAGAGACGTTCCTCAT
CCCACGGGGCCTCATGCACTTCCAGTTCAACGTGCGTAAGACCGAGGCCTCCATGGTCGTCTCCTTCAACAGCCAGAACC
CCGGCATTGTCTTTCGTGCCCCCTCACGCTCTTCGGCTCCAACCCGCCCATCCCAACGCCGGTGCTCACCAAGGCACTCCGG
GTGGAGGCCAGGGTCGTGGAATTCTCAAGTCCAAGTTTGCCGCTGGGTTTTAATTTCTAGGAGCCTTCCCTGAAATGAT
AATTATATAATTCCATATATGCATGC

Abbildung 7a:

Eigenschaften von pPS24:

Gesamtlänge:	6452 bp
vector Backbone: pBluescript SK+, ganzes Konstrukt zwischen XhoI und SacI	
Schnittstellen.	
GstA1 Promoter:	694-2891
Transcription start:	2892
GstA1 5' UTR	2892-2988
WIR1 5' UTR (part)	2989-3034
WIR1 part of 5' CDS + Intron	3035-3246
Germin 9f-2.8 Gen	3258-4003
ATG Germin	3277
Stop codon:	3949
CamV 35S Terminator:	4017-4210

Sequenz:

CTAAATTGTAAGCGTTAATATTTTGTAAATTCGCGTTAAATTTTGTAAATCAGCTCATTTTTTAACCAATAGGCCG
AAATCGGCAAAATCCCTTATAAATCAAAGAATAGACCGAGATAGGGTTGAGTGTGTCCAGTTTGGAAACAAGAGTCCA
CTATTAAAGAACGTGGACTCCAACGTCAAAGGGCGAAAAACCGTCTATCAGGGCGATGGCCCACTACGTGAACCATCACC
CTAATCAAGTTTTTTGGGGTCGAGGTGCCGTAAAGCACTAAATCGGAACCTAAAGGGAGCCCCGATTTAGAGCTTGAC
GGGGAAGCCGCGCAACGTGGCGAGAAAGGAAGGAAGAAAGCGAAAGGAGCGGGCGCTAGGGCGCTGGCAAGTGTAGCG
GTCACGCTGCGCGTAACCACCACACCCGCCGCGCTTAATGCGCCGCTACAGGGCGCGTCCCATTCGCCATTACAGGCTGCG
CAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCCTCTTCGCTATTACGCCAGCTGGCGAAAGGGGGATGTGCTGCAAGGCGAT
TAAGTTGGGTAACGCCAGGGTTTTCCAGTCACGACGTTGTAAACGACGGCCAGTGAGCGCGCGTAATACGACTCACTA
TAGGGCGAATTGGGTACCGGGCCCCCTCGAGTCTAGAACTAGTGGATCCCCGACGCCGAAGTGGAGCCGACAGCCCCC
AGGTCCCAAGCCCTCGGCAGACTAGATCACTAGCCCTGGATCGGCGAGGTGACTGGATGACGAGCAGCACCTGGTCTGGC
GGGTGTTGGGCGAGTAGAACCAGGGGCGATGGCGACGCGCTGACCTTCTCCCTCACCGGCGATCTGCTCCTTCTGGGTG
GGGTGCGCCGCTGACGTTCTGTTGCGGGGTGGGGTTCGCCGCTGGCGTTCTGCTGCGGGGTGGGAGTCGCCGACCGGC
GTGCTGCTGCTAGGACAATCGGTGAGGCCAGTTAGGTGCTAGCCGATCGATTGGCGAAGAGATCCGAGTCTTGGGAGAT
CAGTGAGGCCAGGTGCTATTTGGCCTATCAATTGGCCAGGTTCTGGGAACGGGGCGTGGCGTGATCAACGAGGTGCTAGG
CTGCTAGCTAGGGAACCTGGATCCTGGAACGTGGAGGAGGCAAGTCCGGTATGCTAAGTACTTTAACTTTCCTTCTTACA
TCCACCTGATTGAGATTATTTTGATCTAAATTAACCTTGCAAAAAATATATGTGTGATATCCATCTACTATAATTGCTTAC
AATCAAAATTATATGTGATTTTTTTTAGTTTAGAAGATTTATATGCACAGTAAATCTGAATGTTCTTACATGCATGATT
TAGTTTAACTTTAAAGAGTTATACTAAGTCTTGTATAAAGAGATCTTTTGGAGCAACACCAACCTCGTGAGGTGTTT
TGCCTACGGAAAGGTTGTGCTATGTAATGATTATTATTAGGATCAAAGTTGTAGGATAAACGTAAAACCTTCTCGATGTA
TCTTTTATACAACATTGTAGTTTAGTTATATATGGAGAGAGTGATTTAACACTTTGTGTTTAAAGAGTAGAATAAGTTATT
CCACACTCTAGCCAAACGAACATTTGGCAAATATCTCGCTAGCTGGTGAGAGCCAGAGCCGTGGAAAGTCTGTCTTGCT
ATTAAGGCACAAGCATCAAACAGGAACATTTAGAGCCATGGAAAAGTGATGTGTCGCTACCAATGGGCCAACTGCTAGC
GATGTAATAATAGCATCAAAGTTGATTTTTTATAGAACATGCAAGGCGTTGGCAAGTGGGAAAATGATTGATCGCTGGCA
AGCTTAACTCTCGGAACCTATAGCATTCAACTGAATCAGAACAAAGATTAAAAAAAATACATTTCCATCGATAGTGAAA
AATTATTCAATTGAGTGACAACGAAAATCATATTGGAATGTACATTTACTTGTGATTTTAAATTAGAGGCATTTTTCTA
CCTTTTTTAGTTAATAAGATATGCATATACCCACCTTAGTGTTTTCGAGACAACGAGAGGGCACATTGCTTTTGGTGCT
ACCATCTCTCTCAAGCCTCAAATAAGTTGTGCGGACACGATTATCTTCCCGCGTTGGAATATCGTGGCCTGGTAGAGCTA
GCGAAAATCTTCCATGTTGGAATATGTGCGGACCCGATAGCCGCCATGCATGTAAAGTCTCTTTTACCTTTACACTTG
CTCAAGTGACACTGTATGTGCGCTACCACTTGCTAAATCAATGGGCCAACTGCTAGCGACGTAATAGTAGCAAGTTGATT
TACAGTGTTTTGCTACAGTTCTCTGACTTTGTTTTCTTCATTTTAGACTAGCTGACTACTGTGCTTACCTGCCTTCCCTT
CTCCACGTTAGAGGATCCAGTTCTGATATTGAGACCTCGACGATGGGAGGAAGGGCGCGATCGATGTGGAGTAATTTGAA
TTTCAAATCTATCTATCTGGGGTATATTGGTCTTCCCGATGTTTGGGGGGCTGTGCGAAATGGGTCCGCGATCTACA
AAAGTGAATGGAGGGAGTAGTTGTTTCTCCAATCCGTACCAACGCACGTGTTTCTAACTAGTACTTACTTCTTCCGACC
ACAATATGGAATAGAGGGAGTATCGATAAACTAACAAAGATGATTACTTACCCGGTTTAAATGATTCAAGAGCTCATTTA
ATTTGGCACTCATCATTTTCATATATCTTTTTTGGTAGAAATGAAATAAAGCAGATCTAGACACTAGCTAAAAAGTCGATG
TAGCCTTGTTATTTCTTGGGCCACGCGGGCGGGTGTGGTGCTCCCTGCTCTGTGTATAAATGGAGATCAACATCCAAG
GCCTCCTCCACACACACACGCTACAGAGCAGAGCAGAGTCTTGCTCCAGTATCTGCCCTCTCCTGCCTGCCTGTAGAGC
ATCCATCACGTGAAGTTCACGGACAACTACGTACACAGGCAGCTAGCTCTCGAAACCTCGCTCGAAACGCACCTGCAGA
TCGCTCTCTTCGTCGTCGTCGCGCGATCATCATCAACAGCTCCGTCTGCCTTGAGGCCACGGCCGTCCACGACGCCGCC
GCCTCAGGTGAGTCGTCGCGGACGGTGTCCGTTCAATTTCTCCCATTTTTGTAATTGATTAACTTGTATACATGCTGACC
TCGACCTGCTGAATAACGTCCGTCCATGGTTTCCCGTCCAGGCACCCCGGGGATCCAGCTTATTACATAGCAAGCATGG
GGTACTCCAAAACCCCTAGTAGCTGGCCTGTTGCAATGCTGTTACTAGCTCCGGCCGTCTTGGCCACCGACCCAGACCCT
CTCCAGGACTTCTGTGTGCGCGACCTCGACGGCAAGGCGGTCTCGGTGAACGGGCACACGTGCAAGCCCATGTGCGAGGC
CGGCGACGACTTCTCTTCTCGTCCAAGTTGGCCAAGGCCGGCAACACGTCCACCCGAACGGCTCCGCCGTGACGGAGC
TCGACGTGGCCGAGTGGCCCGGTACCAACACGCTGGGTGTGTCCATGAACGCGTGGACTTTGCTCCCGGAGGCACCAAC
CCACCACACATCCACCCGCGTGCCACCGAGATCGGCATCGTGATGAAAGGTGAGCTTCTCGTGGGAATCCTTGGCAGCCT
CGACTCCGGGAACAAGCTCTACTCGAGGGTGGTGCAGCGCCGGAGAGACGTTCTCATCCACGGGGCCTCATGCACTTCC
AGTTCAACGTCGGTAAGACCGAGGCCTCCATGGTCTGCTCTTCAACAGCCAGAACCCCGGCATTGTCTTCGTGCCCTC
ACGCTCTTCGGCTCCAACCCGCCCATCCCAACGCCGGTGCTACCAAGGCACTCCGGGTGGAGGCCAGGGTCGTGGAAC
TCTCAAGTCCAAGTTTGCCGCTGGGTTTTAATTTCTAGGAGCCTTCCCTGAAATGATAATTATATAATTCCATATATGCA

TGCCTGCAGGCATGCCCCTGAAATCACCAGTCTCTCTCTACAAATCTATCTCTCTCTATAATAATGTGTGAGTAGTTCC
CAGATAAGGGAATTAGGGTTCTTATAGGGTTTCGCTCATGTGTTGAGCATATAAGAAACCCTTAGTATGTATTTGTATTT
GTAAAATACTTCTATCAATAAAATTTCTAATTCCTAAAACCAAATCCAGGGGTACCGAGCTCGAATTCTAGTCTACGCG
GCCGCGAGCTCCAGCTTTTGTTCCTTTAGTGAGGGTTAATTGCGCGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCTGT
GTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCACACACACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGAG
TGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCCTTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGA
ATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGGGTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGT
CGTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAA
AGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGC
CCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTT
TCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCCTTTCTCCCTTCGG
GAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTGCTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTG
CACGAACCCCCCGTTACGCCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACCTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTT
ATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGT
GGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTT
GGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAA
AAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACCTCACGTTAAGGGATTT
TGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTAAAAATGAAGTTTTTAAATCAATCTAAAGTATA
TATGAGTAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTTCATC
CATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATAC
CGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCCT
GCAACTTTATCCGCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTTCGCCAGTTAATAGTTTGCG
CAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATTCAGCTCCGGTTCCCAAC
GATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCCCTCCGATCGTTGTCAGAAGT
AAGTTGGCCGAGTGTTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTT
TTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAA
TACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAGTGCTCATCATTGGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACCTCTCA
AGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTTCAC
CAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATAC
TCATACTCTTCCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATT
TAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCAC

Fortsetzung Abbildung 7a

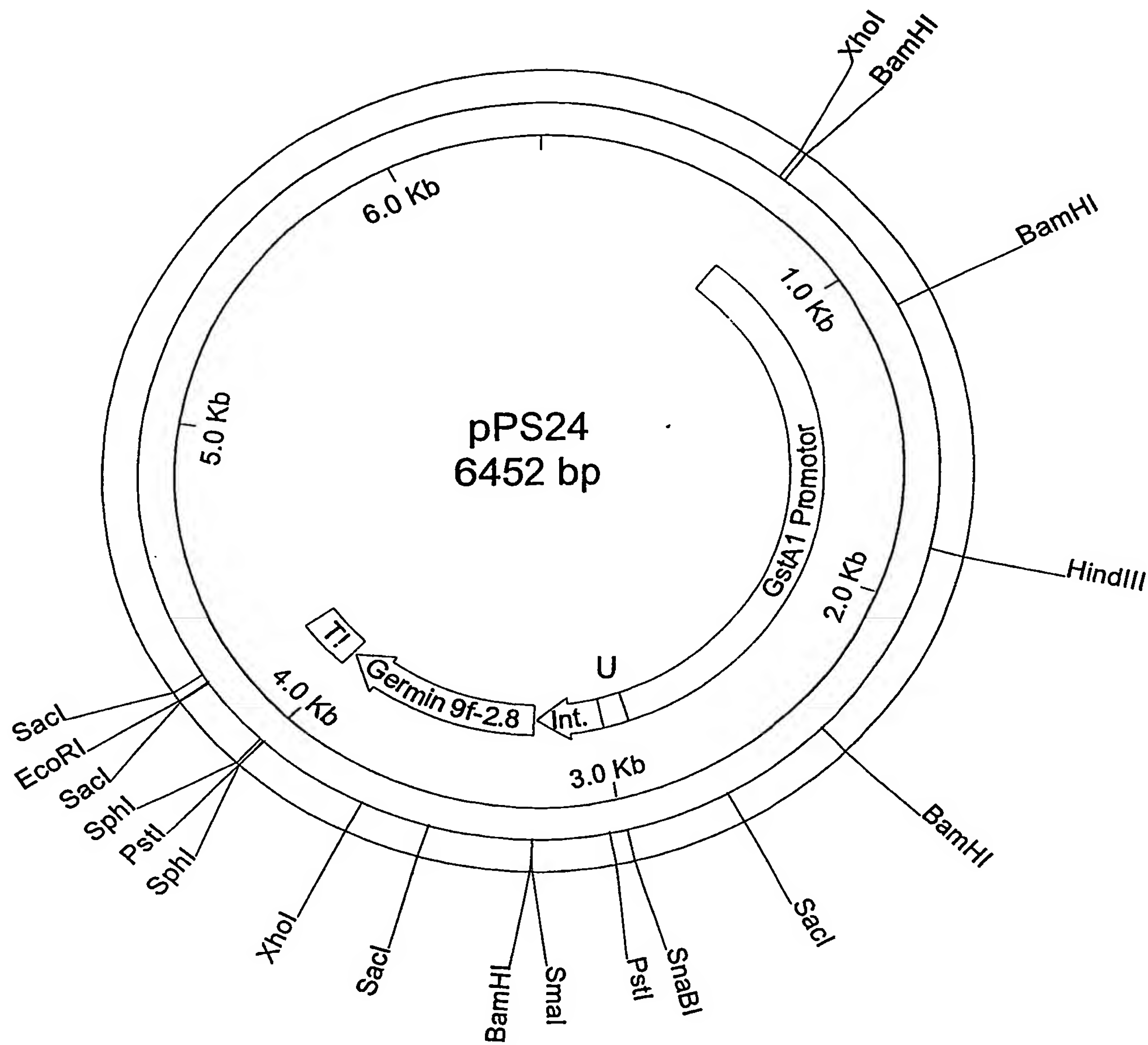


Abbildung 7b

Abbildung 8:

TaMlo inverted repeats and MlaI Intron:

CCACTGTCCACACGAAATGTGCCATCTGAAACGCGTTCTGGAACAGCGTCAGGTGTATGAAGAAGAGGACCCAGTCGGGG
CGGTGGAACCAGAAGAACTTGTGCTGGGCTCGACCACGGGTGCCCCCTTGATGACGCTCGACCGGTCTGGATCTCCAG
GGCCATCTCCATGATGATCATCTCTAGCTTGGTTCCAACACACAAGAGGATGATGAGAGGGATGAAAGAAACCCAGGTGA
GTGTGCCGATCCCGTCGATATCAAGGAAGAGGGTGAGGATCGCCACAGCCCACAGCGGGAGGCTGCGAAAAGAGGCCAAA
TGTGTCAAGATCATGCAACAAGGACCAGCAGGGGCAAAGACCATGACGCAGCAAACCTGATAGTATTGTATCATATGGAAG
CTAAGCAATATCATATGGAGCCTGACGACACTCGTGCCGAATTCGATTCGTGAATTTCTAGAGAACAAAAGGTATGCATC
AATTTAGAAAAAAGTACACTATTATGTGATGTTTGTTCCTATGCTAGTGGAACGGATTAGAATTTTTTTTTTCATTAAGG
TCACCTTTACTGGCATAAGCAGTTCACACTAAACGGTAAACCTTATAGGTGAAAATTTTCAGGCATATATATATATATAT
ATATATATATATGTTTGATTCTTCCGGCTTAACAAAATAATTAGCAAGTACTTCTTGTGTCATTTGTTCCAACGGCTGA
ATTTATTGGCATCGGTCCAAGAAATCCATCTAAATGTTTACATTTACCAAAGTGTGTGTCATGACAGATGTAACAAAT
AATAAACCAAAGGAGAGGAAGGAAAGAGGAAGATAAATGTTACAAAATTTAAATCAAACCTATTTCTACCTTCTCCT
TACCTACCCAGTTTAAAAACACATATTATTTTAAAGAGAGGCAACATGCGCCAAAGGCTACCCTTGAAAATTCCTAAA
ATATTGTACATTTGACTGATGACCAAACAAAAAGTTAAATTGTCTCTTCTTATCACATTATATTTCCATGCATGCCTTT
TTCTGGAACTTACTATCAGCAAAATTTAGATGAAAGGATAATGCCACATAATTTCAAGTCTCCAAGAGATTTGTTAGTTG
TCATATATTAAATTGGTGGGCCAATCTATTCCTGGGTCTTTTTATGTATCTACTTGACCATTTGAACTTCTGTAGTTAAT
TGTATTCTATGAATGATCACTCATCCAAAACCTGTTATTTGTGTTTTACTCTGTTGAATCTTGAATATTTATTCATTTT
GTTTCATCATACGATTGGAGGCCCAATAGATGCTTAATGAGAGTAAGATTATCGATCTCCAAACACATGCTTCTTACTA
GTGTTGAATATATACCCTTTTAGATGTATAGTTCAACCCATAGATTCATATGACCCTCAGCTTCTGATGTGTATGTATG
ACCTTACACTGACACTCTGAACTAATGTAGGTATCTTGTCTGCGAGGAATTCGGCACGAGTGTGTCAGGCTCCATATGA
TATTGCTTAGCTTCCATATGATACAATACTATCAGTTTGCTGCGTCATGGTCTTTGCCCCCTGCTGGTCCCTGTTGCATGA
TCTTGACACATTTGGCCTCTTTTCGCAGCCTCCCGCTGTGGGCTGTGGCGATCCTCACCCCTCTTCTTGATATCGACGGG
ATCGGCACACTCACCTGGGTTTCTTTCATCCCTCTCATCATCCTCTTGTGTGTTGGAACCAAGCTAGAGATGATCATCAT
GGAGATGGCCCTGGAGATCCAGGACCGGTCGAGCGTCATCAAGGGGGCACCCGTGGTTCGAGCCCAGCAACAAGTTCTTCT
GGTTCACCGCCCCGACTGGGTCTTCTTTCATACACCTGACGCTGTTCCAGAACGCGTTTCAGATGGCACATTTCTGTG
TGGACAGGCATGCGACTGG

Abbildung 9a:

Eigenschaften von pWIR5-TaMlo-RNAi:

Gesamtlänge:	7633 bp
vector Backbone: pBluescript SK+, ganzes Konstrukt zwischen XhoI und SacI Schnittstellen.	
GstA1 Promoter:	694-2891
Transcription start:	2892
GstA1 5' UTR	2892-2988
WIR1 5' UTR (part)	2989-3034
WIR1 part of 5' CDS + Intron	3035-3246
TaMlo IR1	3252-3556
Intron MlaI	3698-4731
TaMlo IR2	4877-5190
CamV 35S Terminator:	5191-5391

Sequenz:

CTAAATTGTAAGCGTTAATATTTTGTAAATTCGCGTTAAATTTTGTAAATCAGCTCATTTTTTAACCAATAGGCCG
AAATCGGCAAAATCCCTTATAAATCAAAAGAATAGACCGAGATAGGGTTGAGTGTGTTCCAGTTTGGAACAAGAGTCCA
CTATTAAAGAACGTGGACTCCAACGTCAAAGGGCGAAAAACCGTCTATCAGGGCGATGGCCCACTACGTGAACCATCACC
CTAATCAAGTTTTTTGGGGTCGAGGTGCCGTAAAGCACTAAATCGGAACCCCTAAAGGGAGCCCCGATTAGAGCTTGAC
GGGGAAAGCCGGCGAACGTGGCGAGAAAGGAAGGGAAGAAAGCGAAAGGAGCGGGCGCTAGGGCGCTGGCAAGTGTAGCG
GTCACGCTGCGCGTAACCACCACACCCGCCGCGCTTAATGCGCCGCTACAGGGCGCGTCCCATTGCGCCATTCAGGCTGCG
CAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCCTCTTCGCTATTACGCCAGCTGGCGAAAGGGGGATGTGCTGCAAGGCGAT
TAAGTTGGGTAAACGCCAGGGTTTTCCAGTCACGACGTTGTAAACGACGGCCAGTGAGCGCGCGTAATACGACTCACTA
TAGGGCGAATTGGGTACCGGGCCCCCCTCGAGTCTAGAAGTAGTGGATCCCCGACGCCGAAGTGGAGCCGACAGCCCCC
AGGTCCCAAGCCCTCGGCAGACTAGATCACTAGCCCTGGATCGGCGAGGTGACTGGATGACGAGCAGCACCTGGTCTGGC
GGGTGTTGGGCGAGTAGAACCAGGGGCGATGGCGACGCGCTGACCTTCTCCCTCACCGGCGATCTGCTCCTTCTGGGTG
GGGGTCGCCGGCTGACGTTCTGTTGCGGGGTGGGGGTGCGCCGGCTGGCGTTCTGCTGCGGGGTGGGAGTCGCCGACCGGC
GTGCTGCTGCTAGGACAATCGGTGAGGCCAGTTAGGTGCTAGCCGATCGATTGGCGAAGAGATCCGAGTCCTGGGGAGAT
CAGTGAGGCCAGGTGCTATTTGGCCTATCAATTGGCCAGGTTCTGGGAACGGGGCGTGGCGTGATCAACGAGGTGCTAGG
CTGCTAGCTAGGGAAGTGGATCCTGGAACGTGGAGGAGGCAAGTCCGGTATGCTAAGTACTTTAACTTTCTTCTTCA
TCCACCTGATTGAGTTATTTTGTCTAAATTAACCTTGCAAAAAATATATGTGTGATATCCATCTACTATAATTGCTTAC
AATCAAAATTATATGTGATTTTTTTTAGTTTAGAAGATTATATGCACAGTAAATCTGAATGTTCTTCACATGCATGATT
TAGTTTAACTTTAAAGAGTTATACTAAGTCTTGATAAAGAGATCTTTTGGAGCAACACCAAAACCTCGTGAGGTGTTT
TGCCTACGGAAAGGTTGTGCTATGTAATGATTATTATTAGGATCAAAGTTGTAGGATAAACGTAACCTTCTCGATGTA
TCTTTTATACAACATTGTAGTTTAGTTATATATGGAGAGAGTGATTAAACACTTTGTGTTTAAAGAGTAGAATAAGTTATT
CCACACTCTAGCCAAACGAACCTATTTGGCAAATATCTCGCTAGCTGGTGAGAGCCAGAGCCGTGGAAAGTCTGTCTTGCT
ATTAAGGCACAAGCATCAAACAGGAACATTTAGAGCCATGGAAAAGTGATGTGTCGCCTACCAATGGGCCAACTGCTAGC
GATGTAATAATAGCATCCAAGTTGATTTTTTATAGAACATGCAAGGCGTTGGCAAGTGGGAAAATGATTGATCGCTGGCA
AGCTTAACTCTCGGAACCTATAGCATTCAACTGAATCAGAACAAAGATTAAAAAAAATACATTTCCATCGATAGTGAAA
AATTATTCAATTGAGTGACAACGAAATCATATTGGAATGTACATTTACTTGTGATTTTAAATTAGAGGCATTTTTCTA
CCTTTTTTAGTTAATAAGATATGCATATACCCACCCTTAGTGTTCGAGACAACGAGAGGGGCACATTGCTTTTGGTGCT
ACCATCTCTCTCAAGCCTCAAATAAGTTGTGCGGACACGATTATCTTCCCGCGTTGGAATATCGTGGCCTGGTAGAGCTA
GCGAAAAATCTTCCATGTTGGAATATGTGCGGACGCCGATAGCCGCCATGCATGTAAAGTCTCTTTTACCTTTTAACTTG
CTCAAGTGACACTGTATGTGCGCTACCACTTGCTAAATCAATGGGCCAACTGCTAGCGACGTAATAGTAGCAAGTTGATT
TACAGTGTTTTGCTACAGTTCTCTGACTTTGTTTCTTCATTTTAGACTAGCTGACTACTGTGCTTACCTGCCTTCCCTT
CTCCACGTTAGAGGATCCAGTTCTGATATTGAGACCTCGACGATGGGAGGAAGGGCGCGATCGATGTGGAGTAATTTGAA
TTTCAAATCTATCTATCTGGGGTATATTGGTCTTCACCGATGTTTGGGGGGCTGTGCGAAATTGGTTCCGCGATCTACA
AAAGTGAATGGAGGGAGTAGTTGTTTCTCAATCCGTACCAACGCACGTGTTTCTAACTAGTACTTACTTCTTCCGACC
ACAATATGGAATAGAGGGAGTATCGATAAACTAACAAAGATGATTACTTACCCGGTTTAAATGATTCAAGAGCTCATTTA
ATTTGGCACTCATCATTTTCATATATCTTTTTTGGTAGAAATGAAATAAAGCAGATCTAGACACTAGCTAAAAAGTCGATG
TAGCCTTGTTATTTCTTGGGCCACGCGGGCCGGGTGTGGTGCTCCCTGCTCTGTGTATAAATGGAGATCAACATCCAAG
GCCTCCTCCACACACACACGCTACAGAGCAGAGCAGAGTCTTGCTCCAGTATCTGCCCTCTCCTGCCTGCCTGTAGAGC
ATCCATCACGTGAAGTTACGGGACAACTACGTACACAGGCAGCTAGCTCTCGAAACCTCGCTCGAAACGCACCTGCAGA
TCGCTCTCTTCGTCGTCGTCGCCGCGATCATCATCAACAGCTCCGTCTGCCCTTGGAGCCACGGCCGTCCACGACGCCGCC
GCCTCAGGTCAGTCGTCGGACGGTGTCCGTTTCTTCTCCCATTTTTTGTAAATTGATTAACTTGTATACATGCTGACC
TCGACCTGCTGAATAACGTCCGTCCATGGTTTCCCGTCCAGGCACCCGGGCCACTGTCCACACGAAATGTGCCATCTGA
AACGCGTTCTGGAACAGCGTCAGGTGTATGAAGAAGAGGACCCAGTCGGGGCGGTGGAACCAGAAGAACTGTTGCTGGG
CTCGACCACGGGTGCCCTTGTATGACGCTCGACCGGTCTGGATCTCCAGGGCCATCTCCATGATGATCATCTCTAGCT
TGGTTCCAACACACAAGAGGATGATGAGAGGGATGAAAGAAACCCAGGTGAGTGTGCCGATCCCGTCGATATCAAGGAAG
AGGGTGAGGATCGCCACAGCCACAGCGGGAGGCTGCGAAAAGAGGGCCAAATGTGTCAAGATCATGCAACAAGGACCAGC
AGGGGCAAGACCATGACGCAGCAAACTGATAGTATTGTATCATATGGAAGCTAAGCAATATCATATGGAGCCTGACGAC
ACTCGTGCCGAATTCGATTCGTGAATTTCTAGAGAACAAAGGTATGCATCAATTTAGAAAAAAGTACACTATTATGTGA
TGTTTGTTCCTATGCTAGTGGAACGGATTAGAATTTTTTTTTCATTAAGGTCACCTTTACTGGCATAAGCAGTTCACAC

TAAACGGTAAACCTTATAGGTGAAAATTTTCAGGCATATATATATATATATATATATATATGTTTGATTCTTTCCGGC
TTAACAAAATAATTAGCAAGTACTTCTTGTTGCATTTGTTCCAACGGCTGAATTTATTGGCATCGGTCCAAGAAATCCAT
CTAAATGTTTTACATTTACCAAAGTGTGTGTCATGACAGATGTAACAAAATAAAACCAAAGGAGAGGAAGGAAAGAG
GAAGATAAATGTTACAAAATTTAAATCAAACCTTATTTCTACCTTTCTCCTTACCTACCCAGTTTAAAAACACATATTAT
ATTTTAAAGAGAGGCAACATGCGCCAAAGGCTACCCTTGAAAATTCCTAAAATATTGTACATTTGACTGATGACCAAACA
AAAAGTTAAATTGTCTCTTCTTATCACATTATATTTCCATGCATGCCTTTTTCTGGAACTTACTATCAGCAAAATTTA
GATGAAAGGATAATGCCACATAATTTCACTCTCCAAGAGATTTGTTAGTTGTCATATATTAAATTGGTGGGCCAATCTAT
TCCTGGGTCTTTTTATGTATCTACTTGACCATTTGAACTTCTGTAGTTAATTGTATTCTATGAATGATCACTCATCCAAA
AACTTGTTATTTGTGTTTTACTCTGTTGAATCTTGAATATTTATTCAATTTGTTTCATCATACGATTGGAGGCCATAATA
GATGCTTAATGAGAGTAAGATTATCGATCTCCAAACACATGCTTCTTACTAGTGTGAATATATACCCTTTTAGATGTAT
AGTTCAACCCATAGATTATATGACCTCAGCTTTCTGATGTGTATGTATGACCTTACACTGACACTCTGAACTAATGTA
GGTATCTTGTCTGCAGGAATTCGGCACGAGTGTGTCAGGCTCCATATGATATTGCTTAGCTTCCATATGATACAATAC
TATCAGTTTGCTGCGTCATGGTCTTTGCCCTGCTGGTCTTGTGTCATGATCTTGACACATTTGGCCTCTTTTCGCAGC
CTCCCGCTGTGGGCTGTGGCGATCCTCACCTCTTCTTGATATCGACGGGATCGGCACACTCACCTGGGTTTCTTTTCAT
CCCTCTCATCATCCTCTTGTGTGTTGGAACCAAGCTAGAGATGATCATCATGGAGATGGCCCTGGAGATCCAGGACCGGT
CGAGCGTCATCAAGGGGGCACCCGTGGTTCGAGCCCAGCAACAAGTTCTTCTGGTTCACCCGCCCCGACTGGGTCTCTTC
TTCATACACCTGACGCTGTTCCAGAACGCGTTTCAGATGGCACATTTCTGTGGACAGGCATGCGACTGGGCATGCCCGC
TGAAATCACCAGTCTCTCTCTACAAATCTATCTCTCTATAATAATGTGTGAGTAGTTCCAGATAAGGGAATTAGGGT
TCTTATAGGGTTTTGCTCATGTGTTGAGCATATAAGAAACCCTTAGTATGTATTTGTATTTGTAAAATACTTCTATCAAT
AAAATTTCTAATTCCTAAAACCAAATCCAGGGGTACCGAGCTCGAATTTCTAGTCTACGCGGCCGCGAGCTCCAGCTTTT
GTTCCCTTTAGTGAGGGTTAATTGCGCGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTC
ACAATTCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAAT
TGCGTTGCGCTCACTGCCCCGCTTTCCAGTCGGGAAACCTGTCTGTCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGA
GAGGCGGTTTGCCTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCTGTTCCGGCTGCGGCGAGCG
GTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAGAACATGTGAGCAAAAGG
CCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACA
AAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTC
GTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCA
TAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCCGTTGAGGTGCTTCCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCCGTTTCA
CCGACCGCTGCGCTTATCCGGTAATATCGTCTTGAAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCC
ACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACAC
TAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCA
AACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTGTGTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGAT
CCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAAACGAAACTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAA
AAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTAAAAATGAAGTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAACTTGGTCTG
ACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCC
GTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACC
GGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCTGCAACTTTATCCGCCTCCA
TCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCCGCCAGTTAATAGTTTGCGCAACGTTGTTGCCATTGCT
ACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCTTGGTATGGCTTCATTACGCTCCGGTTCCTAACGATCAAGGCGAGTTACATG
ATCCCCCATGTTGTGCAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCTCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGAGTGTAT
CACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTAC
TCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCC
ACATAGCAGAACTTTAAAGTGCTCATCATTTGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACCTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGA
GATCCAGTTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTTACCAGCGTTTCTGGGTGAGCA
AAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCTTTTCA
ATATTATTGAAGCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAG
GGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCAC

Fortsetzung Abbildung 9a

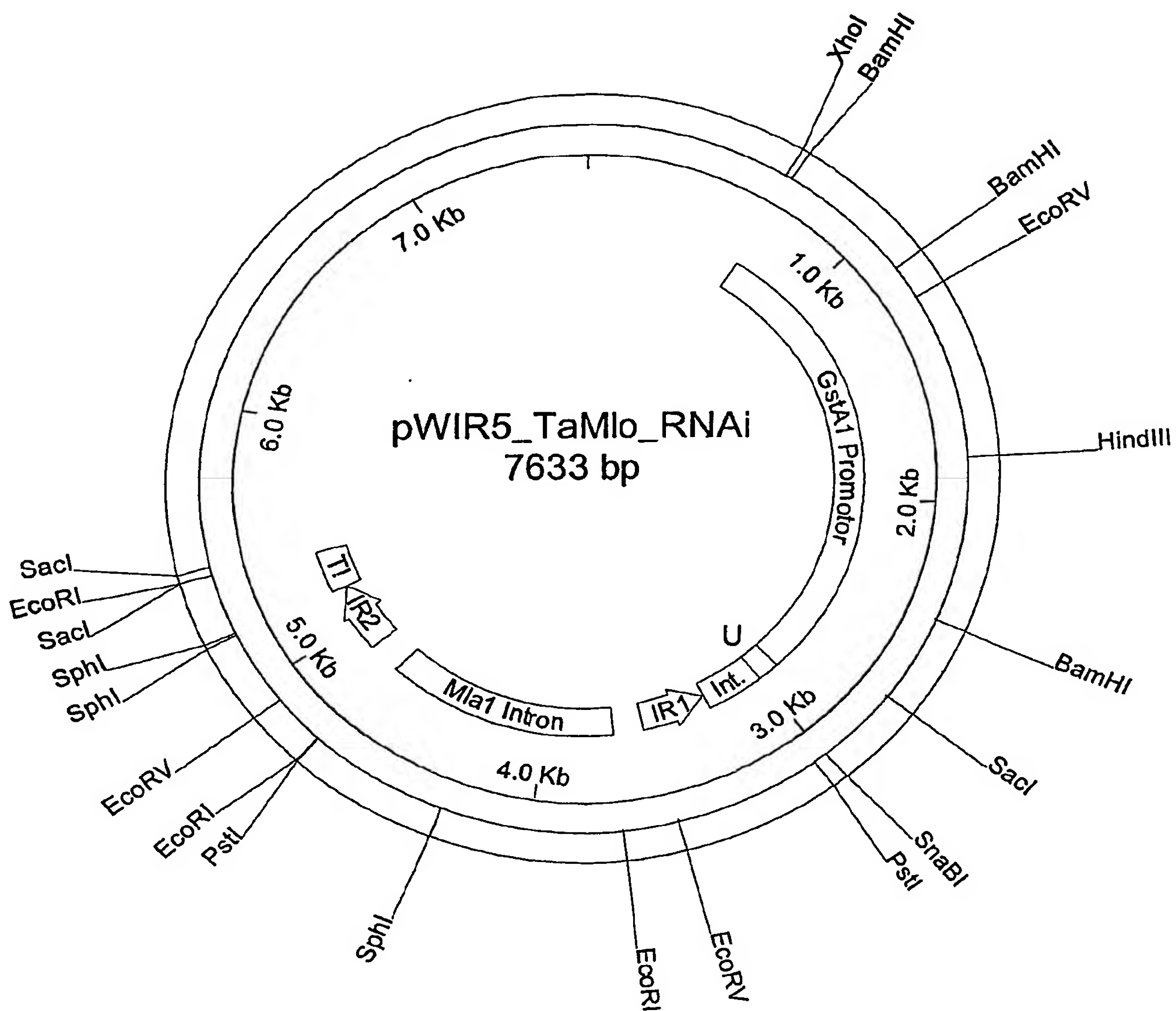


Abbildung 9b

Abbildung 10:

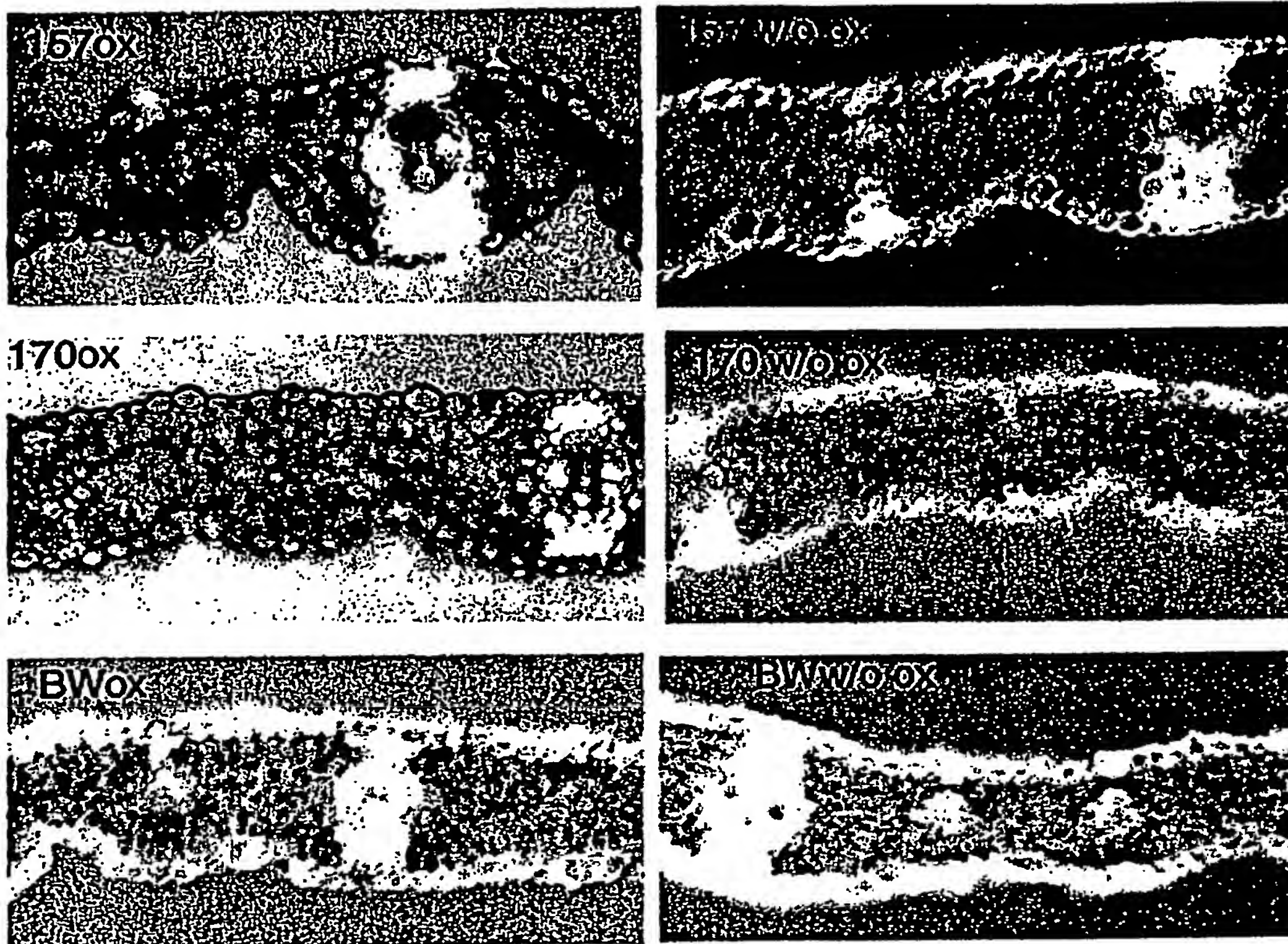
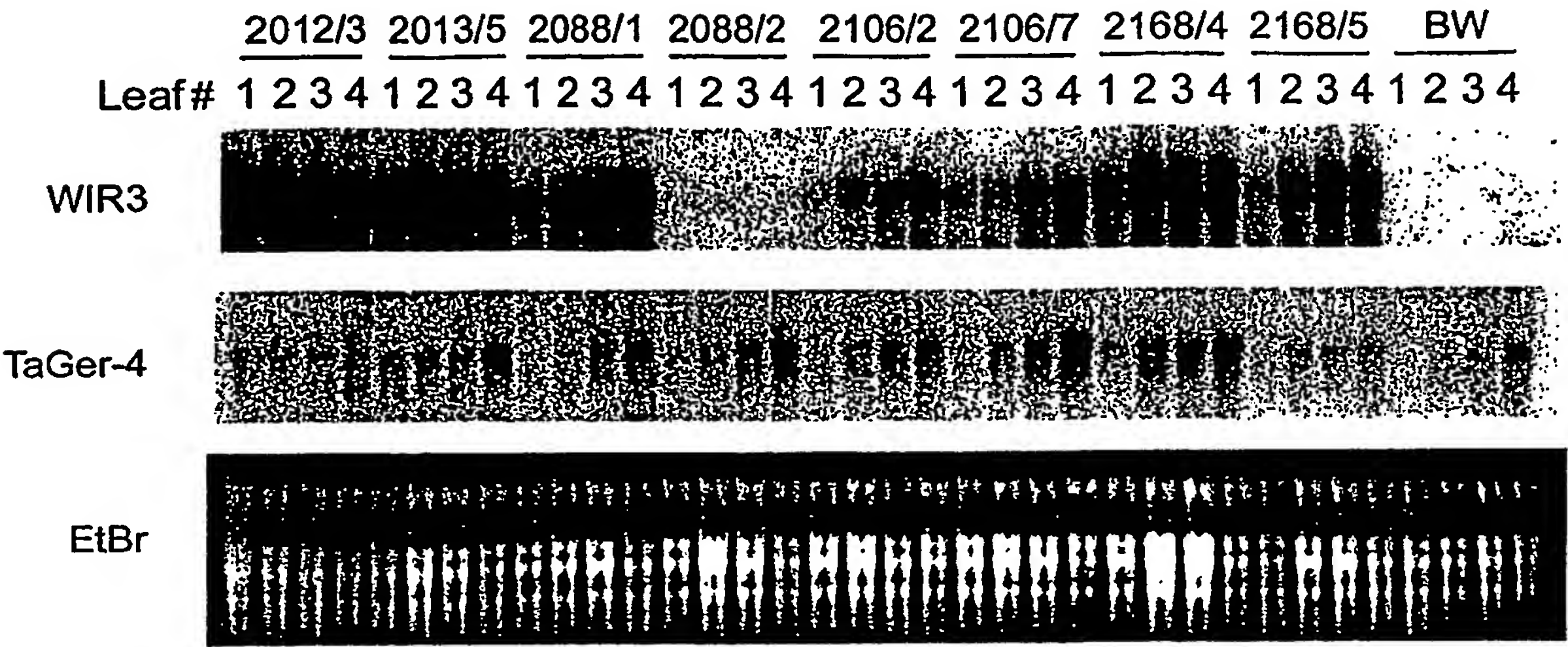


Abbildung 11:

a)



b)

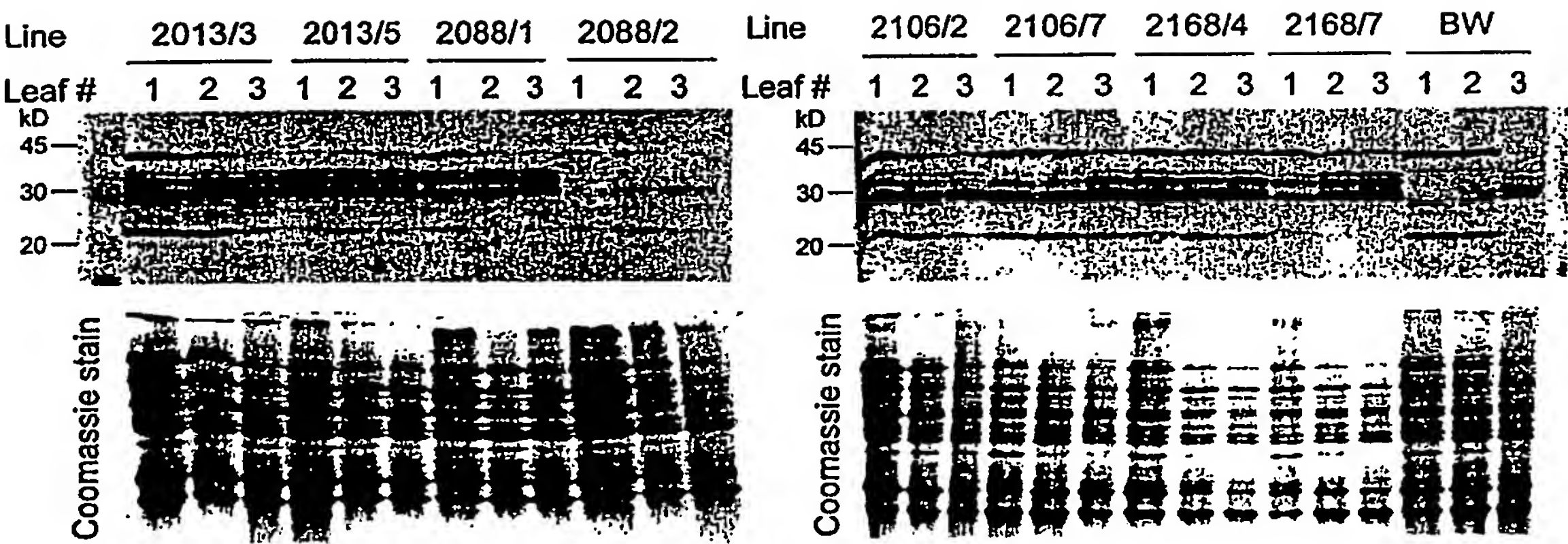


Abbildung 12 A

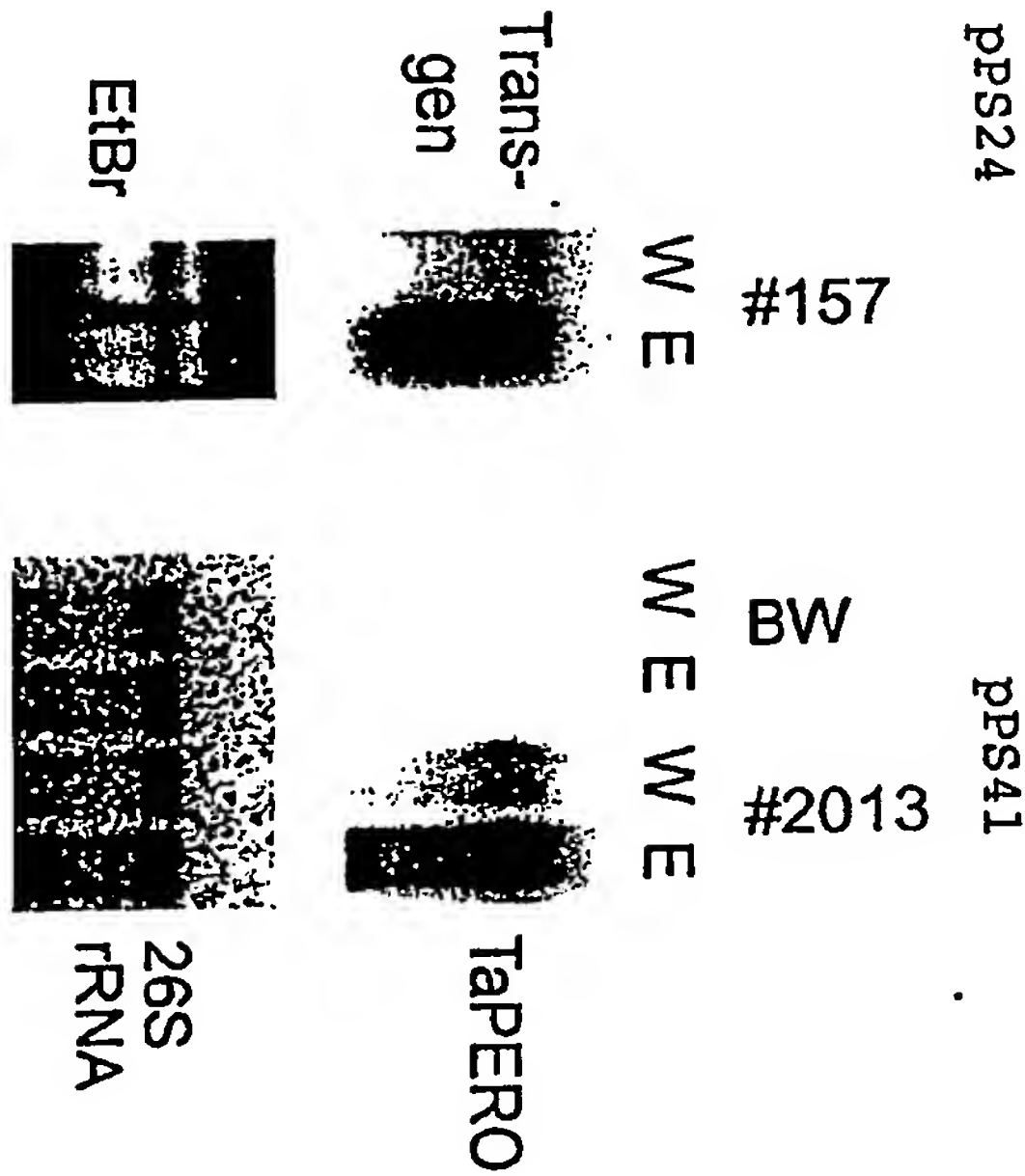


Abbildung 12 B

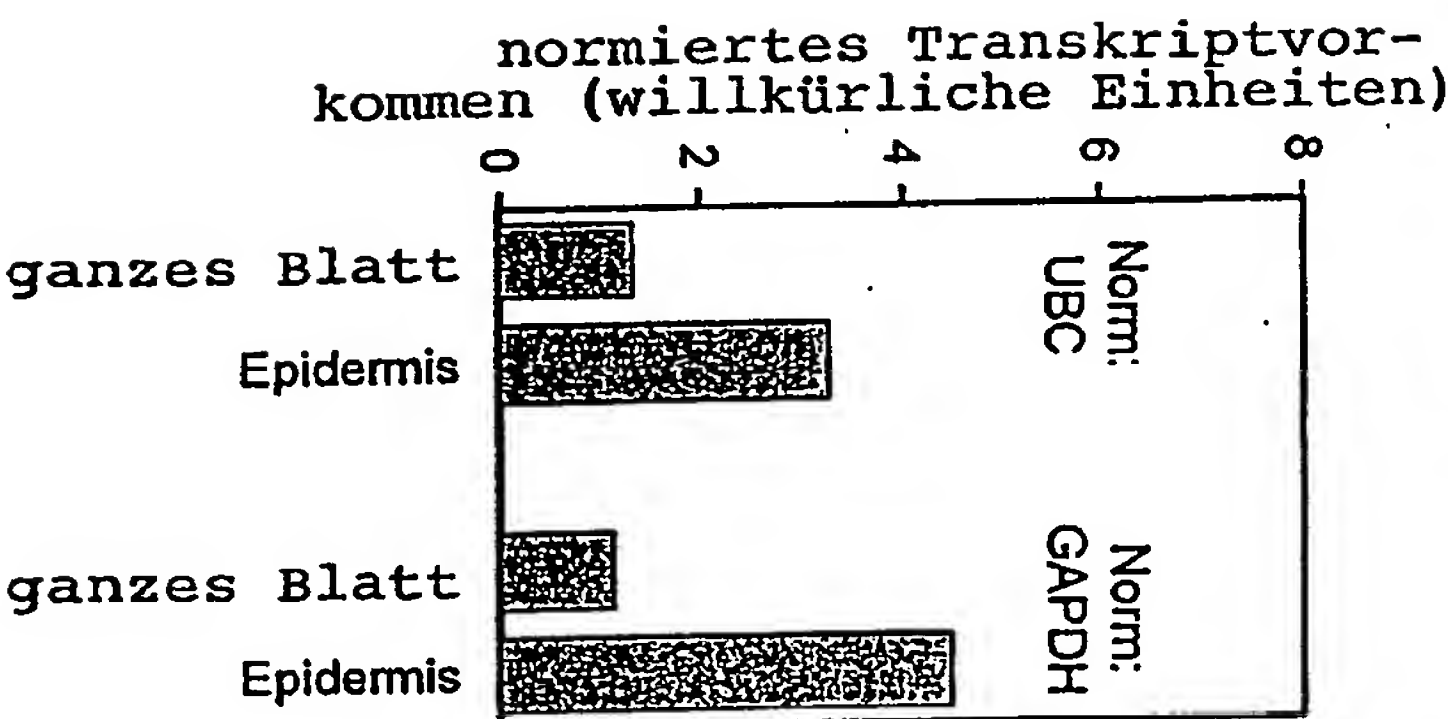


Abbildung 12 C

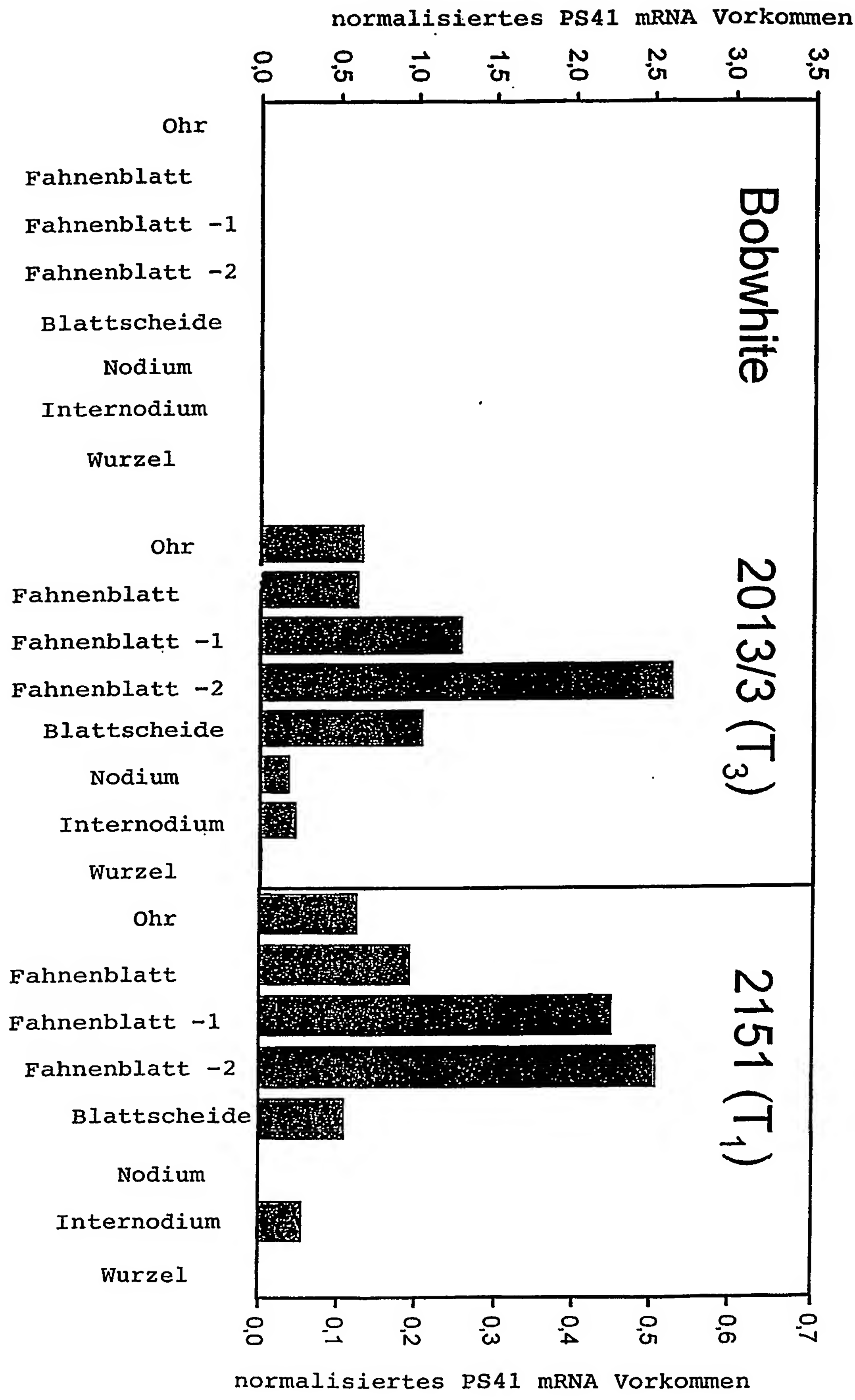
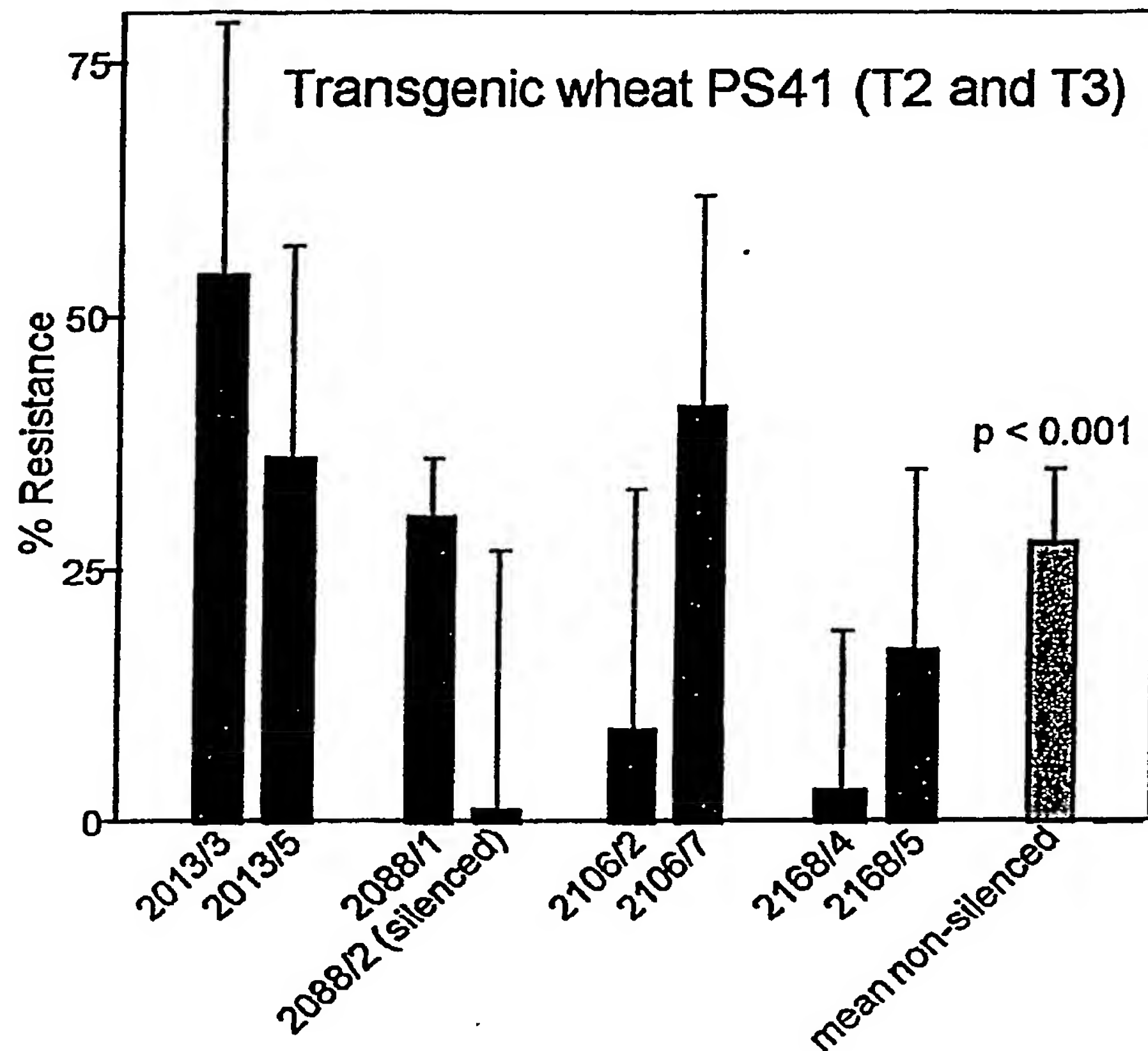


Abbildung 13

Mehltauresistenz von transgenen Weizenlinien, die das pPS41 Konstrukt tragen.



Das Fahnenblatt adulter Pflanzen wurde abgeschnitten und in einem „detached leaf assay“ mit Weizenmehltau inokuliert, zusammen mit Bobwhite Wildtyppflanzen. 7 Tage nach Inokulation wurde der Mehлтаubefall bonitiert. Mittelwerte aus 3 unabhängigen Inokulationsexperimenten mit Pflanzen der T2 und T3 Generation. Sublinie 2088/2 exprimiert kein TAPERO und ist nicht erhöht resistent. Mean non-silenced = Mittelwert aus allen Linien außer 2088/2 und allen Experimenten.

Abbildung 14

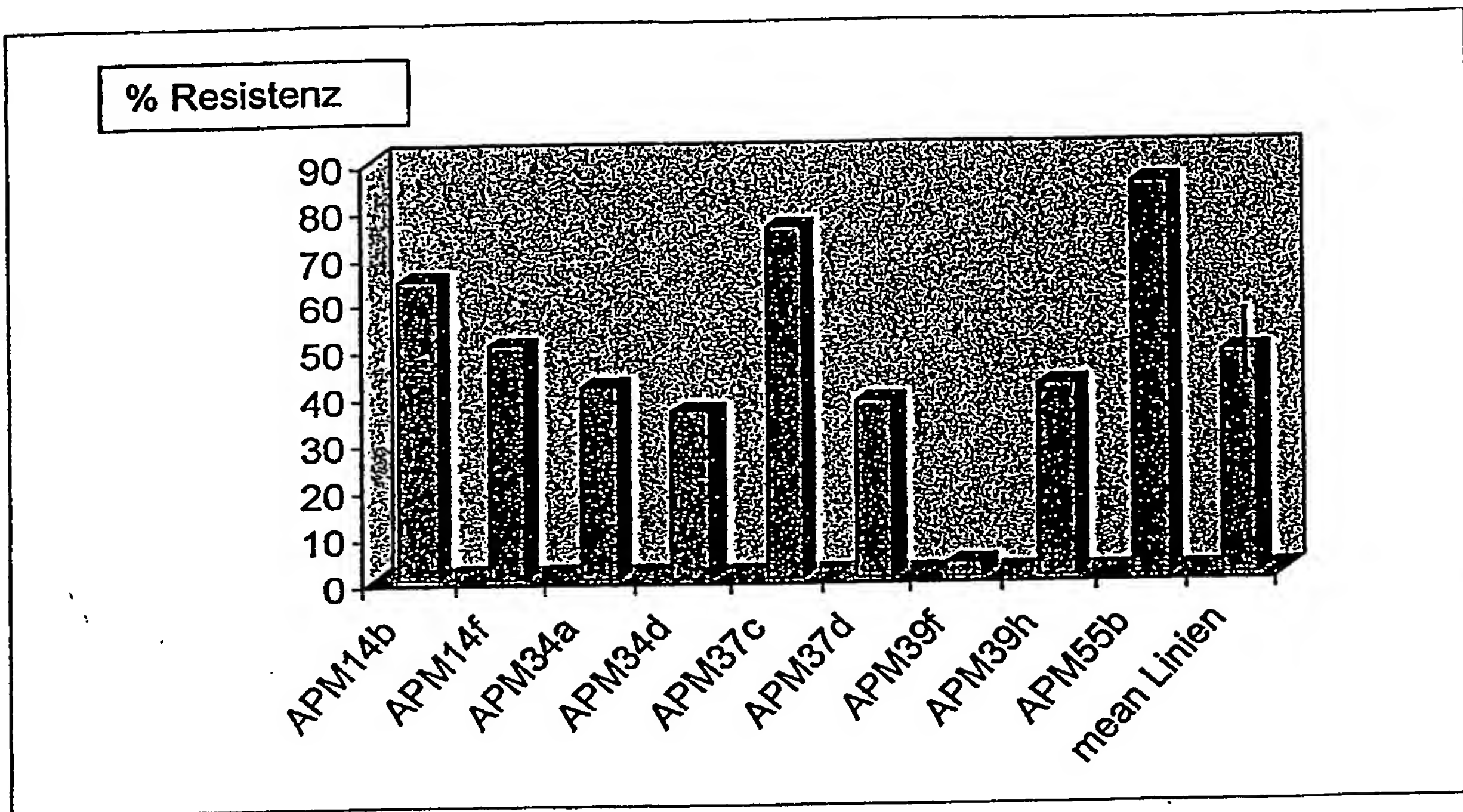
Normaler Wachstumsphänotyp transgener Pflanzen, die das pPS41 Konstrukt tragen.



Pflanzen der T2 Generation wurden zusammen mit Bobwhite Widtyppflanzen ausgesät und im Adultpflanzenstadium fotografiert.

Abbildung 15

Mehltauresistenz von transgenen Weizenlinien, die das pWIR5-TaMlo-RNAi Konstrukt tragen.



Das Fahnenblatt adulter Pflanzen der T2 Generation wurde abgeschnitten und in einem „detached leaf assay“ mit Weizenmehltau inokuliert, zusammen mit Bobwhite Wildtyppflanzen. 7 Tage nach Inokulation wurde der Mehлтаubefall bonitiert. Je 2 Sublinien pro Linie wurden getestet.

SEQUENZPROTOKOLL

<110> IPK Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanze

<120> Promotor zur epidermisspezifischen Transgenexpression
in Pflanzen

<130> I 7469

<140> DE 103 46 611.8

<141> 2003-10-07

<160> 15

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 2198

<212> DNA

<213> Triticum sp.

<400> 1

gacgccgaag	tggagccgac	agccccccagg	tcccaagccc	tgggcagact	agatcactag	60
ccctggatcg	gcgaggtgac	tggatgacga	gcagcacctg	gtctggcggg	tgttgggcga	120
gtagaaccag	gggcgatggc	gacgcgctga	ccttctcccc	tcaccggcga	tctgctcctt	180
ctgggtgggg	gtcgccggct	gacgttctgt	tgcgggggtg	gggtcgccgg	ctggcgcttct	240
gctgcggggg	gggagtcgcc	gaccggcggt	ctgctgctag	gacaatcggt	gaggccagtt	300
aggtgctagc	cgatcgattg	gcgaagagat	ccgagtcctg	gggagatcag	tgaggccagg	360
tgctatattg	cctatcaatt	ggccagggtc	tgggaacggg	gcgtggcggt	atcaacgagg	420
tgctaggctg	ctagctaggg	aactggatcc	tggaacgtgg	aggaggcaag	tccggtatgc	480
taagtacttt	aactttcctt	cttcacatcc	acctgattca	gattattttg	atctaaatta	540
acttgcaaaa	aatatatgtg	tgatatccat	ctactataat	tgcttacaat	caaaattata	600
tgtgattttt	tttagtttag	aagattttata	tgcacagtaa	atctgaatgt	tcttcacatg	660
catgatttag	tttaacttta	aagagttata	ctaactagtc	ttgataaaga	gatcttttgg	720
agcaacacca	aacctcgtga	ggtgttttgc	ctacggaaag	ggtgtgctat	gtaatgatta	780
ttattaggat	caaagttgta	ggataaacgt	aaaaccttct	cgatgtatct	tttatacaac	840
attgtagttt	agttatatat	ggagagagtg	atttaacact	ttgtgtttta	gagtagaata	900
agttattcca	cactctagcc	aaacgaacta	tttggcaaat	atctcgctag	ctgggtgagag	960
ccagagccgt	ggaaagtctg	tcttgctatt	aaggcacaag	catcaaacag	gaacatttag	1020
agccatggaa	aagtgatgtg	tcgcctacca	atgggccaac	tgctagcgat	gtaataatag	1080
catccaagtt	gattttttat	agaacatgca	aggcgttggc	aagtgggaaa	atgattgadc	1140
gctggcaagc	ttaactctcg	gaacttatag	cattcaactg	aatcagaaca	aagattaaaa	1200
aaaaatacat	ttccatcgat	agtgaaaaat	tattcaattg	agtgacaacg	aaaatcatat	1260
tggaatgtac	atttacttgt	tgatttttaaa	ttagaggcat	ttttctacct	tttttagtta	1320
ataagatatg	catataccca	cccttagtgt	tttcgagaca	acgagagggc	acattgcttt	1380
tggtgctacc	atctctctca	agcctcaaat	aagttgtgcg	gacacgatta	tcttcccgcg	1440
ttggaatata	gtggcctggg	agagctagcg	aaaaatcttc	catgttggaa	tatgtcggca	1500
gccggatagc	cgccatgcat	gtaaagtctc	ttttaccttt	acacttgctc	aagtgacact	1560
gtatgtcgcc	taccacttgc	taaatcaatg	ggccaactgc	tagcgacgta	atagtagcaa	1620
gttgattttac	agtgttttgc	tacagtcttc	tgactttgtt	tcttcatttt	agactagctg	1680
actactgtcg	cttacctgcc	ttcccttctc	cacgttagag	gatccagttc	tgatattgag	1740
acctcgacga	tgggaggaag	ggcgcgatcg	atgtggagta	atttgaattt	caaatctatc	1800
tatctggggg	atattggtec	ttcaccgatg	tttggggggc	tgtcggaaat	tggttccgcg	1860
atctacaaaa	gtgaatggag	ggagtagttg	tttctccaat	ccgtaccaac	gcacgtgttt	1920
ctaactagta	cttacttcct	tcgcaccaca	atatggaata	gaggagtagt	cgataaacta	1980
acaaagatga	ttacttaccc	ggttttaaag	attcaagagc	tcattttaatt	tggcactcat	2040
catttcatat	atcttttttg	gtagaaatga	aataaagcag	atctagacac	tagctaaaaa	2100
gtcgatgtag	ccttgttatt	tccttggggc	acgcggggcg	ggtgtggtgc	tccttgctct	2160
gtgtataaat	ggagatcaac	atccaaggcc	tcctccca			2198

<210> 2

<211> 114

<212> DNA

<213> Triticum sp.

<400> 2

gtcagtcgtc	ggacggtgtc	cgttcatttc	ctccccatth	ttgtaattga	ttactttgtt	60
atacatgctg	acctcgacct	gctgaataac	gtccgtccat	ggtttcccgt	ccag	114

<210> 3

<211> 2553

<212> DNA

<213> Triticum sp.

<400> 3

gacgccgaag	tggagccgac	agccccaggg	tcccaagccc	tcggcagact	agatcactag	60
ccctggatcg	gcgaggtgac	tggatgacga	gcagcacctg	gtctggcggg	tggtgggcga	120
gtagaaccag	gggcgatggc	gacgcgctga	ccttctcccc	tcaccggcga	tctgctcctt	180
ctgggtgggg	gtcgccgggt	gacgttctgt	tgcgggggtg	gggtcgccgg	ctggcgcttct	240
gctgcggggg	gggagtcgcc	gaccggcgtg	ctgctgctag	gacaatcggg	gaggccagtt	300
aggtgctagc	cgatcgattg	gcgaagagat	ccgagtcctg	gggagatcag	tgaggccagg	360
tgctatthtg	cctatcaatt	ggccagggtt	tgggaacggg	gcgtggcgtg	atcaacgagg	420
tgctaggctg	ctagctaggg	aactggatcc	tggaaacgtg	aggaggcaag	tccgggtatgc	480
taagtactth	aactthtcct	cttcacatcc	acctgattca	gattatthtg	atctaaatta	540
acttgcaaaa	aatatatgtg	tgatatccat	ctactataat	tgcttacaat	caaaattata	600
tgtgatttht	thtagthtag	aagattthata	tgcacagtaa	atctgaatgt	tcttcacatg	660
catgattthg	thtaactthta	aagagthtata	ctaactagtc	ttgataaaga	gatctthtg	720
agcaacacca	aacctcgtga	ggtgthttgc	ctacggaaag	gttggtgctat	gtaatgatta	780
ttattaggat	caaagthgta	ggataaacgt	aaaaccttct	cgatgtatct	thtatacaac	840
attgtagtht	agthtatata	ggagagagtg	atttaacact	thgtgthttaa	gagtagaata	900
agthtatcca	cactctagcc	aaacgaacta	thtgccaaat	atctcgctag	ctgggtgagag	960
ccagagccgt	ggaaagtctg	tcttgctatt	aaggcacaag	catcaaacag	gaacattthg	1020
agccatggaa	aagtgatgtg	tcgcctacca	atgggccaac	tgctagcgat	gtaataatag	1080
catccaagth	gattthttat	agaacatgca	aggcgttgcc	aagtgggaaa	atgattgatc	1140
gctggcaagc	thtaactctcg	gaacttatag	cattcaactg	aatcagaaca	aagattaaaa	1200
aaaaatacat	thccatcgat	agtgaataat	tattcaattg	agtgaacaac	aaaatcatat	1260
tggaatgtac	atthactthg	tgattthttaa	thtagaggcat	thttctacct	thttthagtta	1320
ataagatatg	catataccca	cccttagtgt	thtcgagaca	acgagagggc	acattgctth	1380
tggtgctacc	atctctctca	agcctcaaat	aagthgtgcg	gacacgatta	tcttcccgcg	1440
thggaatata	gtggcctggg	agagctagcg	aaaaatcttc	catgthggaa	tatgtcggca	1500
gccgatagc	cgccatgcac	gtaaagtctc	thttacctth	acacttgctc	aagtgaact	1560
gtatgtcgcc	taccactthg	taaatcaatg	ggccaactgc	tagcgacgta	atagtagcaa	1620
gthgattthac	agthgtthtg	tacagthtctc	tgactthgtt	tcttcattht	agactagctg	1680
actactgtcg	cttacctgcc	thccctthtctc	cacgttagag	gatccagtht	tgatattgag	1740
acctcgacga	tgggaggaag	ggcgcgatcg	atgtggagta	atthgaattt	caaatctatc	1800
tatctggggg	atattgggtcc	thcaccgatg	thtggggggc	tgctcggaat	tggttccgcg	1860
atctacaaaa	gtgaatggag	ggagtagtht	thtctccaat	ccgtaccaac	gcacgtgtht	1920
ctaactagta	cttactthct	tcgcaccaca	atatggaata	gaggagat	cgataaacta	1980
acaaagatga	thactthacc	ggtthtaaat	atthcaagagc	tcattthaat	tggcactcat	2040
cattthcatat	atctthttthg	gtagaaatga	aataaagcag	atctagacac	tagctaaaaa	2100
gtcgatgtag	cctthgttht	thcctthggcc	acgcggggcg	ggtgtggtgc	thcctgctct	2160
gtgtataaat	ggagatcaac	atccaaggcc	thcctcccaca	cacacacgct	acagagcaga	2220
gcagagtctt	gctccagtat	ctgccctctc	ctgcctgcct	gtagagcatc	catcacgtga	2280
agthcacgga	caaactacgt	acacaggcag	ctagctctcg	aaacctcgct	cgaaacgcac	2340
ctgcagatcg	ctctcttcgt	cgctcgctcg	gcgatcatca	tcaacagctc	cgctctgcct	2400
ggagccacgg	ccgtccacga	cgccggccgc	tcaggctcagt	cgctcgacgg	tgctccgttca	2460
thtctctccc	atthttgtaa	thgattaaact	tgthtatacat	gctgacctcg	acctgctgaa	2520
taacgtccgt	ccatggthtct	ccgtccaggc	acc			2553

<210> 4

<211> 1246

<212> DNA

<213> Triticum sp.

<400> 4

accaccacac	cactccacca	gtaagaagtg	cagcaggtag	ctagtaagcc	ggcgtagctt	60
tgctcttgca	gctagctagc	taaccatggc	cgcctctgcc	tcttgccctt	ctcttggtgt	120
gctcgtggct	ctggccacgg	cggcgtcggc	gcagctgtca	ccgaccttct	acgacacgtc	180
ctgccccagg	gccctggcca	tcatcaagag	tggcgtcatg	gccgccgtga	gcagcgaccc	240
tcggatgggc	gcgtcgctgc	tccggctgca	cttccacgac	tgcttcgtcc	aaggctgcga	300
cgcgtctgtt	ttgctgtctg	gcatggaaca	aaatgctatc	ccgaacgcgg	ggtcgctgag	360
gggcttcggc	gtcatcgaca	gcatcaagac	gcagatcgag	gccatctgca	atcagaccgt	420
ctcctgcgcc	gacatcctca	ccgtcgccgc	ccgtgactcc	gttgtagccc	tcggagggcc	480
gtcatggaca	gtccctctgg	ggagaagaga	ttccacagat	gcaaacgagg	cggcggcaaa	540
cagcgacctg	ccaggcttta	catctagccg	gtcagatctt	gagctggcat	tcagaaacaa	600
gggcctcctt	acgatcgaca	tgggtggccct	ctcgggcgcg	cacaccatcg	gccaggcgca	660
gtgtgggacc	tttaaggaca	ggatctacaa	tgagactaac	atcgacacgg	ccttcgccac	720
atctctccgg	gccaactgcc	ccaggtaaaa	cggcgacggg	agcctggcga	acctggacac	780
gacgacggcc	aacacgttcg	ataacgccta	ctacaccaac	ctcatgtcac	agaaggggct	840
cctgcactcg	gaccagggtgc	tggtcaacaa	cgacaccacc	gacaacactg	tcgggaactt	900
tgcgtcgaac	ccagcggcgt	tcagcagcgc	cttcacgacc	gccatgatca	agatgggcaa	960
catcgcgccg	aagacaggca	cgcaggggca	gatcaggctc	agctgctcca	gggtgaactc	1020
gtgattgata	gacgagttac	tgcatactag	ccagcacgac	acgtacgtga	atgaataagg	1080
ccacagaacc	agtggccaat	ataaatacca	gctcttgaaa	ccgtgtatct	tatgtacgag	1140
tagcagcaaa	tcatgcatgc	atctacacat	atatatgtaa	cgatcgaatt	cccactttct	1200
catgcaaagg	catggagaat	tactatcaat	cttagttata	cgtgta		1246

<210> 5

<211> 7011

<212> DNA

<213> Triticum sp.

<400> 5

ctaaattgta	agcgttaata	ttttgttaaa	attcgcgtta	aattttttgtt	aaatcagctc	60
atttttttaac	caataggccg	aaatcggcaa	aatcccttat	aaatcaaaag	aatagaccga	120
gatagggttg	agtgttggtc	cagtttgtaa	caagagtcca	ctattaaaga	acgtggactc	180
caacgtcaaa	gggcgaaaaa	ccgtctatca	gggcgatggc	ccactacgtg	aaccatcacc	240
ctaatacaagt	tttttggggt	cgagggtgcc	taaagcacta	aatcgggaacc	ctaaagggag	300
cccccgattt	agagcttgac	ggggaaagcc	ggcgaacgtg	gcgagaaagg	aagggaagaa	360
agcgaaagga	gcgggcgcta	gggcgctggc	aagtgtagcg	gtcacgctgc	gcgtaaccac	420
cacacccgcc	gcgcttaatg	cgccgctaca	gggcgcgtcc	cattcgccat	tcaggctgcg	480
caactgttgg	gaagggcgat	cggtgcgggc	ctcttcgcta	ttacgccagc	tggcgaaagg	540
gggatgtgct	gcaaggcgat	taagttgggt	aacgccaggg	ttttcccagt	cacgacgttg	600
taaaacgacg	gccagtgagc	gcgcgtaata	cgactcacta	tagggcgaat	tgggtaccgg	660
gccccccctc	gagtctagaa	ctagtggatc	cccagcgcgc	aagtggagcc	gacagccccc	720
aggtoccaag	ccctcggcag	actagatcac	tagccctgga	tcggcgagggt	gactggatga	780
cgagcagcac	ctgggtctggc	gggtgttggt	cgagtagaac	caggggcgat	ggcgacgcgc	840
tgaccttctc	ccctcaccgg	cgatctgctc	cttctgggtg	ggggtcgccg	gctgacgttc	900
tggttgccggg	tgggggtcgc	cggctggcgt	tctgctgcgg	ggtgggagtc	gccgaccggc	960
gtgctgctgc	taggacaatc	ggtgaggcca	gttaggtgct	agccgatcga	ttggcgaaaga	1020
gatccgagtc	ctggggagat	cagtgaggcc	aggtgctatt	tggcctatca	attggccagg	1080
ttctgggaac	ggggcgtggc	gtgatcaacg	aggtgctagg	ctgctagcta	gggaactgga	1140
tcctggaacg	tggaggaggc	aagtcgggta	tgctaagtac	tttaactttc	cttcttcaca	1200
tccacctgat	tcagattatt	ttgatctaaa	tttaacttgca	aaaaatatat	gtgtgatata	1260
catctactat	aattgcttac	aatcaaaatt	atatgtgatt	tttttttagtt	tagaagattt	1320
atatgcacag	taaatctgaa	tgttcttcac	atgcatgatt	tagtttaact	ttaaagagtt	1380
atactaacta	gtcttgataa	agagatcttt	tggagcaaca	ccaaacctcg	tgagggtgtt	1440
tgocctacgga	aaggttgtgc	tatgtaatga	ttattattag	gatcaaagtt	gtaggataaa	1500
cgtaaaacct	tctcgatgta	tcttttatac	aacattgtag	tttagttata	tatggagaga	1560
gtgattttaac	actttgtgtt	taagagtaga	ataagttatt	ccacactcta	gccaacgaa	1620
ctattttggca	aatatctcgc	tagctgggtga	gagccagagc	cgtggaaagt	ctgtcttgct	1680
attaaggcac	aagcatcaaa	cagggaacatt	tagagccatg	gaaaagtgat	gtgtcgctta	1740
ccaatgggoc	aactgctagc	gatgtaataa	tagcatccaa	gttgattttt	tatagaacat	1800
gcaaggcggt	ggcaagtggg	aaaatgattg	atcgctggca	agcttaactc	tcgggaactta	1860
tagcattcaa	ctgaatcaga	acaaagatta	aaaaaaaaata	catttccatc	gatagtga	1920

aattattcaa	ttgagtgaca	acgaaaatca	tattggaatg	tacatttact	tgttgatttt	1980
aaattagagg	cattttttcta	ccttttttag	ttaataagat	atgcatatac	ccacccttag	2040
tgttttcgag	acaacgagag	ggcacattgc	ttttggtgct	accatctctc	tcaagcctca	2100
aataagttgt	gcggacacga	ttatcttccc	gcgttggaat	atcgtggcct	ggtagagcta	2160
gcgaaaaatc	ttccatggtg	gaatatgtcg	gcagccggat	agccgccatg	catgtaaagt	2220
ctctttttacc	tttacacttg	ctcaagtgac	actgtatgtc	gcctaccact	tgctaaatca	2280
atggggccaac	tgctagcgac	gtaatagtag	caagttgatt	tacagtgttt	tgctacagtt	2340
ctctgacttt	gtttcttcat	tttagactag	ctgactactg	tcgcttacct	gccttccctt	2400
ctccacgtta	gaggatccag	ttctgatatt	gagacctcga	cgatgggagg	aagggcgcgga	2460
tcgatgtgga	gtaatttgaa	tttcaaactc	atctatctgg	ggtatatttg	tccttcaccg	2520
atgtttgggg	ggctgtcggg	aattggttcc	gcgatctaca	aaagtgaatg	gagggagtag	2580
ttgtttctcc	aatccgtacc	aacgcacgtg	tttctaacta	gtacttactt	ccttcgcacc	2640
acaatatgga	atagagggag	tatcgataaa	ctaacaaaga	tgattactta	cccggtttaa	2700
atgattcaag	agctcattta	atttggcact	catcatttca	tatatctttt	ttggtagaaa	2760
tgaaataaag	cagatctaga	cactagctaa	aaagtcgatg	tagccttggt	atttccttgg	2820
gccacgcggg	ccgggtgtgg	tgctccctgc	tctgtgtata	aatggagatc	aacatccaag	2880
gcctcctccc	acacacacac	gctacagagc	agagcagagt	cttgctccag	tatctgccct	2940
ctcctgcctg	cctgtagagc	atccatcacg	tgaagttcac	ggacaaacta	cgtacacagg	3000
cagctagctc	tcgaaacctc	gctcgaaacg	cacctgcaga	tcgctctctt	cgtcgtcgtc	3060
gccgcgatca	tcatacaacag	ctccgtctgc	cttgagagcca	cggccgtcca	cgacgccgcc	3120
gcctcaggtc	agtcgtcggg	cgggtgtccgt	tcatttcctc	cccatTTTTg	taattgatta	3180
acttgttata	catgctgacc	tcgacctgct	gaataacgtc	cgtccatggg	ttcccgtcca	3240
ggcaccgccg	gctgcaggaa	ttcaccacca	caccactcca	ccagtaagaa	gtgcagcagg	3300
tagctagtaa	gccggcgtag	ctttgctctt	gcagctagct	agctaaccat	ggccgcctct	3360
gcctcttgcc	tttctcttgt	ggtgctcgtg	gctctggcca	cggcggcgct	ggcgagctg	3420
tcaccgacct	tctacgacac	gtcctgcccc	agggccctgg	ccatcatcaa	gagtggcgct	3480
atggccgccg	tgagcagcga	ccctcggatg	ggcgcgctcg	tgctccggct	gcacttccac	3540
gactgcttcg	tccaaggctg	cgacgcgtct	gttttgctgt	ctggcatgga	acaaaatgct	3600
atcccgaacg	cggggctcgt	gaggggcttc	ggcgctcatc	acagcatcaa	gacgcagatc	3660
gaggccatct	gcaatcagac	cgtctcctgc	gccgacatcc	tcaccgtcgc	cgcccgtagc	3720
tccgtttag	ccctcggagg	gccgtcatgg	acagtccttc	tggggagaag	agattccaca	3780
gatgcaaacg	aggcggcggc	aaacagcgac	ctgccaggct	ttacatctag	ccggtcagat	3840
cttgagctgg	cattcagaaa	caagggcctc	cttacgatcg	acatgggtgg	cctctcgggc	3900
gcgcacacca	tcggccaggc	gcagtgtggg	acctttaagg	acaggatcta	caatgagact	3960
aacatcgaca	cggccttcgc	cacatctctc	cgggccaaact	gccccaggct	aaacggcgac	4020
gggagcctgg	cgaacctgga	cacgacgacg	gccaacacgt	tcgataacgc	ctactacacc	4080
aacctcatgt	cacagaaggg	gctcctgcac	tcggaccagg	tgctgttcaa	caacgacacc	4140
accgacaaca	ctgtccggaa	ctttgcgtcg	aaccagcgcg	cgttcagcag	cgccttcacg	4200
accgccatga	tcaagatggg	caacatcgcg	ccgaagacag	gcacgcaggg	gcagatcagg	4260
ctcagctgct	ccagggtgaa	ctcgtgattg	atagacgagt	tactgcatac	tagccagcac	4320
gacacgtacg	tgaatgaata	aggccacaga	accagtggcc	aatataaata	ccagctcttg	4380
aaaccgtgta	ttttatgtac	gagtagcagc	aatcatgca	tgcatctaca	catatatatg	4440
taacgatcga	attcccactt	tctcatgcaa	aggcatggag	aattactatc	aatcttagtt	4500
atacgtgtat	aaaaagcggc	cgcgaattcg	atatcaagct	tatcgatacc	gtcgacctcg	4560
acctgcaggc	atgcccgctg	aatcaccag	tctctctcta	caaactctatc	tctctctata	4620
ataatgtgtg	agtagttccc	agataaggga	attagggttc	ttataggggt	tcgctcatgt	4680
gttgagcata	taagaaaccc	ttagtatgta	tttgatattg	taaaataactt	ctatcaataa	4740
aattttcta	tcctaaaacc	aaaatccagg	ggtaccgagc	tcgaattcta	gtctacgcgg	4800
ccgcgagctc	cagcttttgt	tcccttttagt	gagggttaat	tgcgcgcttg	gcgtaatcat	4860
ggtcatagct	gtttcctgtg	tgaaattgtt	atccgctcac	aattccacac	aacatacgag	4920
ccggaagcat	aaagtgtaaa	gcctgggggtg	cctaattgagt	gagctaactc	acattaattg	4980
cgttgcgctc	actgcccgtc	ttccagtcgg	gaaacctgtc	gtgccagctg	cattaatgaa	5040
tcggccaacg	cgcggggaga	ggcggtttgc	gtattggggc	ctcttccgct	tcctcgctca	5100
ctgactcgct	gcgctcggtc	gttcggctgc	ggcgagcggt	atcagctcac	tcaaaggcgg	5160
taatacgggt	atccacagaa	tcaggggata	acgcaggaaa	gaacatgtga	gcaaaaggcc	5220
agcaaaaggc	caggaaccgt	aaaaaggccg	cgttgctggc	gtttttccat	aggctccgcc	5280
cccctgacga	gcatacacia	aatcgacgct	caagtacagag	gtggcgaaac	ccgacaggac	5340
tataaagata	ccaggcggtt	ccccctggaa	gctccctcgt	gcgctctcct	gttccgaccc	5400
tgccgcttac	cggatacctg	tccgcctttc	tcccttcggg	aagcgtggcg	ctttctcata	5460
gctcacgctg	taggtatctc	agttcggtgt	aggtcgttcg	ctccaagctg	ggctgtgtgc	5520
acgaaccccc	cgttcagccc	gaccgctgcg	ccttatccgg	taactatcgt	cttgagtcca	5580
acccggtaag	acacgactta	tcgccactgg	cagcagccac	tggtaacagg	attagcagag	5640
cgaggtatgt	aggcgggtgt	acagagttct	tgaagtgggtg	gcctaactac	ggctacacta	5700

gaaggacagt	atttggtatc	tgcgctctgc	tgaagccagt	taccttcgga	aaaagagttg	5760
gtagctcttg	atccggcaaa	caaaccaccg	ctggtagcgg	tggttttttt	gtttgcaagc	5820
agcagattac	gcgagaaaa	aaaggatctc	aagaagatcc	tttgatcttt	tctacggggt	5880
ctgacgctca	gtggaacgaa	aactcacgtt	aagggatttt	ggtcatgaga	ttatcaaaaa	5940
ggatcttcac	ctagatcctt	ttaaattaaa	aatgaagttt	taaatcaatc	taaagtatat	6000
atgagtaaac	ttgggtctgac	agttaccaat	gcttaatcag	tgaggcacct	atctcagcga	6060
tctgtctatt	tcgttcatcc	atagttgcct	gactccccgt	cgtgtagata	actacgatac	6120
gggagggtt	accatctggc	cccagtgtct	caatgatacc	gcgagaccca	cgctcaccgg	6180
ctccagattt	atcagcaata	aaccagccag	ccggaagggc	cgagcgcaga	agtggtcctg	6240
caactttatc	cgcctccatc	cagtctatta	attggtgccg	ggaagctaga	gtaagtagtt	6300
cgccagttaa	tagtttgccg	aacgttggtg	ccattgctac	aggcatcgtg	gtgtcacgct	6360
cgtcgtttgg	tatggcttca	ttcagctccg	gttcccaacg	atcaaggcga	gttacatgat	6420
cccccatgtt	gtgcaaaaaa	gcggttagct	ccttcgggtc	tccgatcgtt	gtcagaagta	6480
agttggccgc	agtgttatca	ctcatgggta	tggcagcact	gcataattct	cttactgtca	6540
tgccatccgt	aagatgcttt	tctgtgactg	gtgagtactc	aaccaagtca	ttctgagaat	6600
agtgtatgcg	gcgaccgagt	tgctcttgcc	cggcgtcaat	acgggataat	accgcgccac	6660
atagcagaac	tttaaaagtg	ctcatcattg	gaaaacgttc	ttcggggcga	aaactctcaa	6720
ggatcttacc	gctgttgaga	tccagttcga	tgtaaccac	tcgtgcaccc	aactgatctt	6780
cagcatcttt	tactttcacc	agcgtttctg	ggtgagcaaa	aacaggaagg	caaaatgccg	6840
caaaaaaggg	aataagggcg	acacggaaat	gttgaatact	catactcttc	ctttttcaat	6900
attattgaag	catttatcag	ggttattgtc	tcatgagcgg	atacatattt	gaatgtattt	6960
agaaaaataa	acaaataggg	gttccgcgca	catttccccg	aaaagtgcc	c	7011

<210> 6

<211> 746

<212> DNA

<213> Triticum sp.

<400> 6

agcttattac	atagcaagca	tgggggtactc	caaaacccta	gtagctggcc	tgttcgcaat	60
gctgttacta	gctccggccg	tcttggccac	cgaccagac	cctctccagg	acttctgtgt	120
cgccgacctc	gacggcaagg	cgggtctcgg	gaacgggcac	acgtgcaagc	ccatgtcggg	180
ggccggcgac	gacttcctct	tctcgcccaa	gttgcccaag	gccggcaaca	cgtccacccc	240
gaacggctcc	gccgtgacgg	agctcgacgt	ggccgagtg	cccggtagca	acacgctggg	300
tgtgtccatg	aaccgcgtgg	actttgctcc	cggaggcacc	aaccaccac	acatccaccc	360
gcgtgccacc	gagatcggca	tcgtgatgaa	aggtgagctt	ctcgtgggaa	tccttggcag	420
cctcgactcc	gggaacaagc	tctactcgag	ggtggtgcgc	gccggagaga	cgttcctcat	480
cccacggggc	ctcatgcact	tccagttcaa	cgtcggtaag	accgaggcct	ccatggtcgt	540
ctccttcaac	agccagaacc	ccggcattgt	cttcgtgccc	ctcacgctct	tcggctccaa	600
cccgcacctc	ccaacgccgg	tgctcaccaa	ggcactccgg	gtggaggcca	gggtcgtgga	660
acttctcaag	tccaagtttg	ccgctggggt	ttaatttcta	ggagccttcc	ctgaaatgat	720
aattatataa	ttccatatat	gcatgc				746

<210> 7

<211> 6452

<212> DNA

<213> Triticum sp.

<400> 7

ctaaattgta	agcgttaata	ttttgttaaa	attcgcgtta	aatttttgtt	aaatcagctc	60
attttttaac	caataggccg	aaatcggcaa	aatcccttat	aaatcaaaag	aatagaccga	120
gatagggttg	agtgttggtc	cagtttgga	caagagtcca	ctattaaaga	acgtggactc	180
caacgtcaaa	gggcgaaaaa	ccgtctatca	gggcgatggc	ccactacgtg	aaccatcacc	240
ctaatacagt	tttttggggg	cgagggtgcc	taaagcacta	aatcgggaacc	ctaaaggagg	300
cccccgattt	agagcttgac	ggggaaagcc	ggcgaacgtg	gcgagaaagg	aagggaagaa	360
agcgaaagga	gcgggcgcta	gggcgctggc	aagtgtagcg	gtcacgctgc	gcgtaaccac	420
cacacccgcc	gcgcttaatg	cgccgctaca	gggcgcgtcc	cattcgccat	tcaggctgcg	480
caactgttgg	gaagggcgat	cgggtgcggc	ctcttcgcta	ttacgccagc	tggcgaaagg	540
gggatgtgct	gcaaggcgat	taagttgggt	aacgccaggg	ttttcccagt	cacgacgttg	600
taaaacgacg	gccagtgagc	gcgcgtaata	cgactcacta	tagggcgaat	tgggtaccgg	660
gccccccctc	gagtctagaa	ctagtggatc	cccagcggcg	aagtggagcc	gacagcccc	720

aggtcccaag	ccctcggcag	actagatcac	tagccctgga	tgggcgaggt	gactggatga	780
cgagcagcac	ctggtctggc	gggtgttggg	cgagtagaac	caggggogat	ggcgacgcgc	840
tgaccttctc	ccctcaccgg	cgatctgctc	cttctgggtg	ggggtcgccg	gctgacgttc	900
tgttgcgggg	tgggggtcgc	cggctggcgt	tctgctgcgg	ggtgggagtc	gccgaccggc	960
gtgctgctgc	taggacaatc	ggtgaggcca	gttaggtgct	agccgatcga	ttggcgaaga	1020
gatccgagtc	ctggggagat	cagtgaggcc	aggtgctatt	tggcctatca	attggccagg	1080
ttctgggaac	ggggcgtggc	gtgatcaacg	aggtgctagg	ctgctagcta	gggaactgga	1140
tcctggaacg	tggaggaggc	aagtccggta	tgctaagtac	tttaactttc	cttcttcaca	1200
tccacctgat	tcagattatt	ttgatctaaa	tttaacttgca	aaaaatatat	gtgtgatatc	1260
catctactat	aattgcttac	aatcaaaatt	atatgtgatt	tttttttagtt	tagaagattt	1320
atatgcacag	taaatctgaa	tgttcttcac	atgcatgatt	tagtttaact	ttaaagagtt	1380
atactaacta	gtcttgataa	agagatcttt	tggagcaaca	ccaaacctcg	tgagggtggtt	1440
tgcttacgga	aagggtgtgc	tatgtaatga	ttattatttag	gatcaaagtt	gtaggataaa	1500
cgtaaaacct	tctcgatgta	tctttttatac	aacattgtag	tttagttata	tatggagaga	1560
gtgatttaac	actttgtgtt	taagagtaga	ataagttatt	ccacactcta	gccaaacgaa	1620
ctattttggca	aatatctcgc	tagctgggtga	gagccagagc	cgtggaaagt	ctgtcttgct	1680
attaaggcac	aagcatcaaa	caggaacatt	tagagccatg	gaaaagtgat	gtgtcgcccta	1740
ccaatgggcc	aactgctagc	gatgtaataa	tagcatccaa	gttgattttt	tatagaacat	1800
gcaaggcggt	ggcaagtggg	aaaatgattg	atcgctggca	agcttaactc	tcggaactta	1860
tagcattcaa	ctgaatcaga	acaaagatta	aaaaaaaaata	catttccatc	gatagtgaag	1920
aattattcaa	ttgagtgaac	acgaaaatca	tattggaatg	tacatttact	tgttgatttt	1980
aaattagagg	cattttttcta	ccttttttag	tttaataagat	atgcatatac	ccacccttag	2040
tgttttcgag	acaacgagag	ggcacattgc	ttttggtgct	accatctctc	tcaagcctca	2100
aataagttgt	gcggacacga	ttatcttccc	gcgttggaat	atcggtggcct	ggtagagcta	2160
gcgaaaaatc	ttccatgttg	gaatatgtcg	gcagccggat	agccgccatg	catgtaaagt	2220
ctcttttacc	tttacacttg	ctcaagtgac	actgtatgtc	gcctaccact	tgctaaatca	2280
atgggccaac	tgctagcgac	gtaatagtag	caagttgatt	tacagtgttt	tgctacagtt	2340
ctctgacttt	gtttcttcat	tttagactag	ctgactactg	tcgcttacct	gccttccctt	2400
ctccacgtta	gaggatccag	ttctgatatt	gagacctcga	cgatgggagg	aagggcgcga	2460
tcgatgtgga	gtaatttgaa	tttcaaactc	atctatctgg	ggtatattgg	tccttcaccg	2520
atgtttgggg	ggctgtcgga	aattgggtcc	gcgatctaca	aaagtgaatg	gagggagtag	2580
ttgtttctcc	aatccgtacc	aacgcacgtg	tttctaacta	gtacttactt	ccttcgcacc	2640
acaatatgga	atagagggag	tatcgataaa	ctaacaaaga	tgattactta	cccggtttaa	2700
atgattcaag	agctcattta	atttggcact	catcatttca	tatatctttt	ttggtagaaa	2760
tgaaataaag	cagatctaga	cactagctaa	aaagtcgatg	tagccttggt	atttccttgg	2820
gccacgcggg	ccgggtgtgg	tgctccctgc	tctgtgtata	aatggagatc	aacatccaag	2880
gcctcctccc	acacacacac	gctacagagc	agagcagagt	cttgctccag	tatctgccct	2940
ctcctgcctg	cctgtagagc	atccatcacg	tgaagttcac	ggacaaacta	cgtacacagg	3000
cagctagctc	tcgaaacctc	gctcgaaacg	cacctgcaga	tcgctctctt	cgtcgtcgtc	3060
gccgcgatca	tcacaaacag	ctccgtctgc	cttgagagcca	cggccgtcca	cgacgcgcgc	3120
gcctcaggtc	agtcgtcgga	cgggtgtcgt	tcatttcctc	cccatttttg	taattgatta	3180
acttgttata	catgctgacc	tcgacctgct	gaataacgtc	cgtccatggg	ttcccgtcca	3240
ggcaccccgg	gggatccagc	ttattacata	gcaagcatgg	ggtactccaa	aaccctagta	3300
gctggcctgt	tcgcaatgct	gttactagct	ccggccgtct	tggccaccga	cccagaccct	3360
ctccaggact	tctgtgtcgc	cgacctcgac	ggcaaggcgg	tctcggtgaa	cgggcacacg	3420
tgcaagccca	tgtcggaggc	cggcgacgac	ttcctcttct	cgtccaagtt	ggccaaggcc	3480
ggcaacacgt	ccaccccgaa	cggctccgcc	gtgacggagc	tcgacgtggc	cgagtggccc	3540
ggtaccaaca	cgctgggtgt	gtccatgaac	cgcgtggact	ttgctcccgg	aggcaccaac	3600
ccaccacaca	tcaccccgcg	tgccaccgag	atcggcacgc	tgatgaaagg	tgagcttctc	3660
gtgggaatcc	ttggcagcct	cgactccggg	aacaagctct	actcgagggt	ggtgcgcgcc	3720
ggagagacgt	tcctcatccc	acggggcctc	atgcacttcc	agttcaacgt	cggtaagacc	3780
gaggcctcca	tggtcgtctc	cttcaacagc	cagaaccccc	gcattgtctt	cgtgcccctc	3840
acgctcttct	gctccaaccc	gccccatcca	acgccgggtg	tcaccaaggc	actccgggtg	3900
gaggccaggg	tcgtggaact	tctcaagtcc	aagtttgccg	ctgggtttta	atttctagga	3960
gccttccttg	aaatgataat	tatataattc	catatatgca	tgcctgcagg	catgcccgtc	4020
gaaatcacca	gtctctctct	acaaatctat	ctctctctat	aataatgtgt	gagtagttcc	4080
cagataaggg	aattagggtt	cttatagggt	ttcgctcatg	tgttgagcat	ataagaaacc	4140
cttagtatgt	atttgtattt	gtaaaatact	tctatcaata	aaatttctaa	ttcctaaaac	4200
caaaatccag	gggtaccgag	ctcgaattct	agtctacgcg	gccgcgagct	ccagcttttg	4260
ttcccttttag	tgagggttaa	ttgcgcgctt	ggcgtaatca	tgggtcatagc	tgtttcctgt	4320
gtgaaattgt	tatccgctca	caattccaca	caacatacga	gccggaagca	taaagtgtaa	4380
agcctggggg	gcctaagtga	tgagctaact	cacattaatt	gcgttgcgct	cactgcccgc	4440
tttccagtcg	ggaaacctgt	cgtgccagct	gcattaatga	atcggccaac	gcgcggggag	4500

aggcgggtttg	cgtattgggc	gctcttccgc	ttcctcgcgc	actgactcgc	tgcgctcggt	4560
cgttcggctg	cggcgagcgg	tatcagctca	ctcaaaggcg	gtaatacggg	tatccacaga	4620
atcaggggat	aacgcaggaa	agaacatgtg	agcaaaaggc	cagcaaaagg	ccaggaaccg	4680
taaaaaggcc	gcgttgctgg	cgtttttcca	taggctccgc	ccccctgacg	agcatcacia	4740
aatcgcagcg	tcaagtcaga	ggtggcgaaa	cccgacagga	ctataaagat	accaggcggt	4800
tccccctgga	agctccctcg	tgcgctctcc	tgttccgacc	ctgccgctta	ccggatacct	4860
gtccgccttt	ctcccttcgg	gaagcgtggc	gctttctcat	agctcacgct	gtaggtatct	4920
cagttcgggtg	taggtcgttc	gctccaagct	gggctgtgtg	cacgaacccc	ccgttcagcc	4980
cgaccgctgc	gccttatccg	gtaactatcg	tcttgagtcc	aacccggtaa	gacacgactt	5040
atcgccactg	gcagcagcca	ctggtaacag	gattagcaga	gcgaggatg	taggcgggtg	5100
tacagagttc	ttgaagtggg	ggcctaacta	cggctacact	agaaggacag	tatttggtat	5160
ctgcgctctg	ctgaagccag	ttaccttcgg	aaaaagagtt	ggtagctctt	gatccggcaa	5220
acaaaccacc	gctggtagcg	gtgggttttt	tgtttgcaag	cagcagatta	cgcgagaaa	5280
aaaaggatct	caagaagatc	ctttgatctt	ttctacgggg	tctgacgctc	agtggaaacga	5340
aaactcacgt	taagggattt	tggtcatgag	attatcaaaa	aggatcttca	cctagatcct	5400
tttaaattaa	aatgaagtt	ttaaatcaat	ctaaagtata	tatgagtaaa	cttggtctga	5460
cagttaccaa	tgcttaatca	gtgaggcacc	tatctcagcg	atctgtctat	ttcgttcatc	5520
catagttagc	tgactccccg	tcgtgtagat	aactacgata	cgggagggct	taccatctgg	5580
cccagtgct	gcaatgatac	cgcgagaccc	acgctcaccc	gctccagatt	tatcagcaat	5640
aaaccagcca	gccggaaggg	ccgagcgcag	aagtggctct	gcaactttat	ccgcctccat	5700
ccagtctatt	aattgttgcc	gggaagctag	agtaagtagt	tcgccagtta	atagtttgcg	5760
caacgttggt	gccattgcta	caggcatcgt	ggtgtcacgc	tcgtcgtttg	gtatggcttc	5820
attcagctcc	ggttcccaac	gatcaaggcg	agttacatga	tcccccatgt	tgtgcaaaaa	5880
agcggttagc	tccttcgggc	ctccgatcgt	tgtcagaagt	aagttggccg	cagtgttatc	5940
actcatgggt	atggcagcac	tgcataattc	tcttactgtc	atgccatccg	taagatgctt	6000
ttctgtgact	ggtgagtact	caaccaagtc	attctgagaa	tagtgtatgc	ggcgaccgag	6060
ttgctcttgc	ccggcgtaaa	tacgggataa	taccgcgcca	catagcagaa	ctttaaaagt	6120
gctcatcatt	ggaaaacggt	cttcggggcg	aaaactctca	aggatcttac	cgctgttgag	6180
atccagttcg	atgtaaccca	ctcgtgcacc	caactgatct	tcagcatctt	ttactttcac	6240
cagcgtttct	gggtgagcaa	aaacaggaag	gcaaaatgcc	gcaaaaaagg	gaataagggc	6300
gacacggaaa	tggtgaatac	tcatactctt	cctttttcaa	tattattgaa	gcatttatca	6360
gggttattgt	ctcatgagcg	gatacatatt	tgaatgtatt	tagaaaaata	aacaaatagg	6420
ggttccgcgc	acatttcccc	gaaaagtgcc	ac			6452

<210> 8

<211> 1939

<212> DNA

<213> Triticum sp.

<400> 8

ccactgtcca	cacgaaatgt	gccatctgaa	acgcgttctg	gaacagcgtc	aggtgtatga	60
agaagaggac	ccagtcgggg	cgggtggaacc	agaagaactt	gttgctgggc	tcgaccacgg	120
gtgccccctt	gatgacgctc	gaccggctct	ggatctccag	ggccatctcc	atgatgatca	180
tctctagctt	ggttccaaca	cacaagagga	tgatgagagg	gatgaaagaa	accaggtga	240
gtgtgccgat	ccgctcgata	tcaagggaaga	gggtgaggat	cgccacagcc	cacagcggga	300
ggctgcgaaa	agaggccaaa	tgtgtcaaga	tcatgcaaca	aggaccagca	ggggcaaaga	360
ccatgacgca	gcaaactgat	agtattgtat	catatggaag	ctaagcaata	tcatatggag	420
cctgacgaca	ctcgtgccga	attcgattcg	tgaattttcta	gagaacaaaa	ggtatgcac	480
aatttagaaa	aaagtacact	attatgtgat	gtttgtttcc	tatgctagt	gaacggatta	540
gaattttttt	ttcatthaagg	tcacctttac	tggcataagc	agttcacact	aaacggtaaa	600
ccttatagggt	gaaaattttc	aggcatatat	atatatatat	atatatatat	atgtttgatt	660
ctttccggct	taacaaaata	attagcaagt	acttcttggt	gcattttgtc	caacggctga	720
atttattggc	atcgggtccaa	gaaatccatc	taaatgtttt	acattttcac	aaagtgtgtg	780
tcatgacaga	tgtaacaaat	aataaaccaa	aaggagagga	aggaaagagg	aagataaatg	840
ttacaaaaat	ttaaatcaaa	cttatttcta	cctttctcct	tacctacca	gtttaaaaac	900
acatattata	ttttaaagag	aggcaacatg	cgccaaaggc	tacccttgaa	aattcctaaa	960
atattgtaca	tttgactgat	gaccaaacia	aaagttaa	tgtctcttcc	ttatcacatt	1020
atatttccat	gcattgcctt	ttctggaaac	ttactatcag	caaaatttag	atgaaaggat	1080
aatgccacat	aatttcagtc	tccaagagat	ttgttagttg	tcatatatta	aattgggtgg	1140
ccaatctatt	cctgggtctt	tttatgtatc	tacttgacca	tttgaacttc	tgtagttaat	1200
tgtattctat	gaatgatcac	tcatccaaaa	acttgttatt	tgtgttttac	tctgttgaat	1260
cttgaatatt	tattcatttt	gttcatcata	cgattggagg	cccataatag	atgcttaatg	1320

agagtaagat	tatcgatctc	caaacacatg	cttcttacta	gtggtgaata	tatacccttt	1380
tagatgtata	gttcaaccca	tagattcata	tgaccctcag	ctttctgatg	tgtatgtatg	1440
accttacact	gacactctga	actaatgtag	gtatcttgtc	ctgcaggaat	tcggcacgag	1500
tgtcgtcagg	ctccatatga	tattgcttag	cttccatatg	atacaatact	atcagtttgc	1560
tgcgtcatgg	tctttgcccc	tgotggctct	tgttgcatga	tcttgacaca	tttggcctct	1620
tttcgcagcc	tcccgtgtgt	ggctgtggcg	atcctcaccc	tcttccttga	tatcgacggg	1680
atcggcacac	tcacctgggt	ttctttcatc	cctctcatca	tcctcttggt	tgttggaacc	1740
aagctagaga	tgatcatcat	ggagatggcc	ctggagatcc	aggaccggtc	gagcgtcatc	1800
aagggggcac	ccgtggtcga	gccagcaac	aagtcttctt	ggttccaccg	ccccgactgg	1860
gtcctcttct	tcatacacct	gacgctgttc	cagaacgcgt	ttcagatggc	acatttcgtg	1920
tggacaggca	tgcgactgg					1939

<210> 9

<211> 7633

<212> DNA

<213> Triticum sp.

<400> 9

ctaaattgta	agcgttaata	ttttgttaaa	attcgcgtta	aattttttggt	aaatcagctc	60
atTTTTtaac	caataggccg	aaatcggcaa	aatcccttat	aaatcaaaag	aatagaccga	120
gatagggttg	agtgttggtc	cagtttggaa	caagagtcca	ctattaaaga	acgtggactc	180
caacgtcaaa	gggcgaaaaa	ccgtctatca	gggcgatggc	ccactacgtg	aaccatcacc	240
ctaatcaagt	tttttggggg	cgagggtgcc	taaagcacta	aatcggaacc	ctaaaggagg	300
cccccgatth	agagcttgac	ggggaaagcc	ggcgaacgtg	gcgagaaagg	aagggaagaa	360
agcgaaagga	gcgggcgcta	gggcgctggc	aagtgtagcg	gtcacgctgc	gcgtaaccac	420
cacaccgcgc	gcgcttaatg	cgccgctaca	gggcgcgtcc	cattcgccat	tcaggctgcg	480
caactgttgg	gaaggcgat	cgggtgcggc	ctcttcgcta	ttacgccagc	tggcgaaagg	540
gggatgtgct	gcaaggcgat	taagttgggt	aacgccaggg	ttttcccagt	cacgacgttg	600
taaaacgacg	gccagtgagc	gcgcgtaata	cgactcacta	tagggcgaaat	tgggtaccgg	660
gccccccctc	gagtctagaa	ctagtggatc	cccagcgccg	aagtggagcc	gacagcccc	720
aggtcccaag	ccctcggcag	actagatcac	tagccctgga	tcggcgaggt	gactggatga	780
cgagcagcac	ctggtctggc	gggtgttggg	cgagtagaac	caggggcgat	ggcgacgcgc	840
tgaccttctc	ccctcacccg	cgatctgctc	cttctgggtg	ggggtcgccg	gctgacgttc	900
tgttgcgggg	tgggggtcgc	cggctggcgt	tctgctgcgg	ggtgggagtc	gccgaccggc	960
gtgctgctgc	taggacaatc	ggtgaggcca	gttaggtgct	agccgatcga	ttggcgaaaga	1020
gatccgagtc	ctggggagat	cagtgaggcc	aggtgctatt	tggcctatca	attggccagg	1080
ttctgggaac	ggggcgtggc	gtgatcaacg	aggtgctagg	ctgctagcta	gggaactgga	1140
tcctggaacg	tggaggaggc	aagtccggta	tgctaagtac	tttaactttc	cttcttcaca	1200
tccacctgat	tcagattatt	ttgatctaaa	ttactttgca	aaaaatatat	gtgtgatata	1260
catctactat	aattgcttac	aatcaaaatt	atatgtgatt	tttttttagtt	tagaagattt	1320
atatgcacag	taaatctgaa	tgttcttcac	atgcatgatt	tagtttaact	ttaaagagtt	1380
atactaacta	gtcttgataa	agagatcttt	tggagcaaca	ccaaacctcg	tgaggtgttt	1440
tgcctacgga	aagggtgtgc	tatgtaatga	ttattattag	gatcaaagtt	gtaggataaa	1500
cgtaaaacct	tctcgatgta	tctttttatac	aacattgtag	tttagttata	tatggagaga	1560
gtgattttaac	actttgtggt	taagagtaga	ataagttatt	ccacactcta	gccaacgaa	1620
ctattttggca	aatatctcgc	tagctgggtga	gagccagagc	cgtggaaagt	ctgtcttgct	1680
attaaggcac	aagcatcaaa	caggaacatt	tagagccatg	gaaaagtgat	gtgtcgccta	1740
ccaatgggcc	aactgctagc	gatgtaataa	tagcatccaa	gttgattttt	tatagaacat	1800
gcaaggcggt	ggcaagtggg	aaaatgattg	atcgctggca	agcttaactc	tcggaactta	1860
tagcattcaa	ctgaatcaga	acaaagatta	aaaaaaaaata	catttccatc	gatagtgaaa	1920
aattattcaa	ttgagtgaca	acgaaaatca	tattggaatg	tacattttact	tgttgatttt	1980
aaattagagg	cattttttcta	cctttttttag	tttaataagat	atgcatatac	ccacccttag	2040
tgtttttcgag	acaacgagag	ggcacattgc	ttttgggtgct	accatctctc	tcaagcctca	2100
aataagttgt	gcggacacga	ttatcttccc	gcgttggaat	atcggtggcct	ggtagagcta	2160
gcgaaaaatc	ttccatggtg	gaatatgtcg	gcagccggat	agccgccatg	catgtaaagt	2220
ctctttttacc	tttacacttg	ctcaagtgac	actgtatgtc	gcctaccact	tgctaaatca	2280
atgggccaac	tgctagcgac	gtaatagtag	caagttgatt	tacagtgttt	tgctacagtt	2340
ctctgacttt	gtttcttcat	tttagactag	ctgactactg	tcgcttacct	gccttccctt	2400
ctccacgtta	gaggatccag	ttctgatatt	gagacctcga	cgatgggagg	aagggcgcga	2460
tcgatgtgga	gtaatttgaa	tttcaaatct	atctatctgg	ggtatattgg	tccttcaccg	2520
atgtttgggg	ggctgtcgga	aattggttcc	gcgatctaca	aaagtgaatg	gagggagtag	2580
ttgtttctcc	aatccgtacc	aacgcacgtg	tttctaacta	gtacttactt	ccttcgcacc	2640

acaatatgga	atagagggag	tatcgataaa	ctaacaaaga	tgattactta	cccggtttaa	2700
atgattcaag	agctcattta	atttggcact	catcatttca	tatatctttt	ttggtagaaa	2760
tgaaataaag	cagatctaga	cactagctaa	aaagtcgatg	tagccttggt	atttccttgg	2820
gccacgcggg	ccgggtgtgg	tgctccctgc	tctgtgtata	aatggagatc	aacatccaag	2880
gcctcctccc	acacacacac	gctacagagc	agagcagagt	cttgctccag	tatctgccct	2940
ctcctgcctg	cctgtagagc	atccatcaag	tgaagttcac	ggacaaacta	cgtacacagg	3000
cagctagctc	tcgaaacctc	gctcgaaacg	cacctgcaga	tcgctctctt	cgtcgtcgtc	3060
gccgcgatca	tcatcaacag	ctccgtctgc	cttgaggcca	cggccgtcca	cgacgccgcc	3120
gcctcaggtc	agtcgtcgga	cgggtgtccgt	tcatttccctc	cccatTTTTg	taattgatta	3180
acttgttata	catgctgacc	tcgacctgct	gaataacgtc	cgtccatggg	ttcccgtcca	3240
ggcaccgccg	gccactgtcc	acacgaaatg	tgccatctga	aacgcgttct	ggaacagcgt	3300
caggtgtatg	aagaagagga	cccagtcggg	gcgggtggaac	cagaagaact	tgttgctggg	3360
ctcgaccacg	ggtgccccct	tgatgacgct	cgaccgggtc	tggatctcca	gggccatctc	3420
catgatgatc	atctctagct	tggttccaac	acacaagagg	atgatgagag	ggatgaaaga	3480
aaccaggtg	agtgtgccga	tcccgtcgat	atcaaggaag	agggtgagga	tcgccacagc	3540
ccacagcggg	aggctgcgaa	aagaggccaa	atgtgtcaag	atcatgcaac	aaggaccagc	3600
aggggcaaag	accatgacgc	agcaaactga	tagtattgta	tcatatggaa	gctaagcaat	3660
atcatatgga	gcctgacgac	actcgtgccg	aattcgattc	gtgaatttct	agagaacaaa	3720
aggtatgcat	caatttagaa	aaaagtacac	tattatgtga	tgtttgtttc	ctatgctagt	3780
ggaacggatt	agaatttttt	tttcattaag	gtcaccttta	ctggcataag	cagttcacac	3840
taaacggtaa	accttatagg	tgaaaatttt	caggcatata	tatatatata	tatatatata	3900
tatgtttgat	tctttccggc	ttaacaaaat	aattagcaag	tacttcttgt	tgcatTTgtt	3960
ccaacggctg	aattttattgg	catcgggtcca	agaaatccat	ctaaatgttt	tacatttcac	4020
caaagtgtgt	gtcatgacag	atgtaacaaa	taataaacca	aaaggagagg	aaggaaagag	4080
gaagataaat	gttacaaaaa	tttaaatcaa	acttatttct	acctttctcc	ttacctacc	4140
agtttaaaaa	cacatattat	attttaaaga	gaggcaacat	gcgccaagg	ctacccttga	4200
aaattcctaa	aatattgtac	atttgactga	tgaccaaaca	aaaagttaaa	ttgtctcttc	4260
cttatcacat	tatatTTcca	tgcatgcctt	tttctggaaa	cttactatca	gcaaaattta	4320
gatgaaagga	taatgccaca	taatttcagt	ctccaagaga	tttgttagtt	gtcatataatt	4380
aaattgggtg	gccaatctat	tcctgggtct	ttttatgtat	ctacttgacc	atttgaactt	4440
ctgtagttaa	ttgtattcta	tgaatgatca	ctcatccaaa	aacttgttat	ttgtgtttta	4500
ctctgttgaa	tcttgaatat	ttattcattt	tgttcatcat	acgattggag	gcccataata	4560
gatgcttaat	gagagtaaga	ttatcgatct	ccaaacacat	gcttcttact	agtgttgaat	4620
atataccctt	ttagatgtat	agttcaacct	atagattcat	atgacctca	gctttctgat	4680
gtgtatgtat	gaccttacac	tgacactctg	aactaatgta	ggtatcttgt	cctgcaggaa	4740
ttcggcacga	gtgtcgtcag	gctccatatg	atattgctta	gcttccatat	gatacaatac	4800
tatcagtttg	ctgcgtcatg	gtctttgccc	ctgctgggtc	ttgttgcatg	atcttgacac	4860
atttggcctc	ttttcgcagc	ctcccgctgt	gggctgtggc	gatcctcacc	ctcttccttg	4920
atatcgacgg	gatcggcaca	ctcacctggg	tttctttcat	ccctctcatc	atcctcttgt	4980
gtgttggaac	caagctagag	atgatcatca	tgagatggc	cctggagatc	caggaccggt	5040
cgagcgtcat	caagggggca	cccgtgggtc	agcccagcaa	caagttcttc	tggttccacc	5100
gccccgactg	ggtcctcttc	ttcatacacc	tgacgctggt	ccagaacgcg	tttcagatgg	5160
cacatttcgt	gtggacagge	atgcgactgg	gcatgcccgc	tgaaatcacc	agtctctctc	5220
tacaaatcta	tctctctcta	taataatgtg	tgagtagttc	ccagataagg	gaattagggg	5280
tcttataggg	tttcgctcat	gtgttgagca	tataagaaac	ccttagtatg	tatttgtatt	5340
tgtaaaatac	ttctatcaat	aaaatttcta	attcctaaaa	ccaaaatcca	ggggtagcca	5400
gctcgaattc	tagtctacgc	ggccgcgagc	tccagctttt	gttcccttta	gtgaggggta	5460
attgocgcgt	tggcgtaatc	atggtcatag	ctgtttcctg	tgtgaaattg	ttatccgctc	5520
acaattccac	acaacatacg	agccggaagc	ataaagtgtg	aagcctgggg	tgccaatga	5580
gtgagctaac	tcacattaat	tgcggttgcc	tcactgccc	ctttccagtc	gggaaacctg	5640
tcgtgccagc	tgcattaatg	aatcggccaa	cgcgcgggga	gaggcggttt	gcgtattggg	5700
cgctcttccg	cttcctcgct	cactgactcg	ctgcgctcgg	tcgttcgggt	gcggcgagcg	5760
gtatcagctc	actcaaaggc	ggtaatacgg	ttatccacag	aatcagggga	taacgcagga	5820
aagaacatgt	gagcaaaaagg	ccagcaaaaag	gccaggaacc	gtaaaaaggc	cgcgttgctg	5880
gcgtttttcc	ataggctccg	ccccctgac	gagcatcaca	aaaatcgacg	ctcaagtcag	5940
aggtggcgaa	acccgacagg	actataaaga	taccaggcgt	ttccccctgg	aagctccctc	6000
gtgcgctctc	ctgttccgac	cctgccgctt	accggatacc	tgtccgcctt	tctcccttcg	6060
ggaagcgtgg	cgctttctca	tagctcacgc	tgtaggtatc	tcagttcggg	gtaggtcgtt	6120
cgctccaagc	tgggctgtgt	gcacgaaccc	cccgttcagc	ccgaccgctg	cgccttatcc	6180
ggtaactatc	gtcttgagtc	caacccggtg	agacacgact	tatcgccact	ggcagcagcc	6240
actggtaaca	ggattagcag	agcgagggtat	gtaggcgggtg	ctacagagtt	cttgaagtgg	6300
tggcctaact	acggctacac	tagaaggaca	gtatttggtg	tctgcgctct	gctgaagcca	6360
gttaccttcg	gaaaaagagt	tggtagctct	tgatccggca	aacaaaccac	cgctggtagc	6420

10/11

```

ggtgggttttt ttgtttgcaa gcagcagatt acgogcagaa aaaaaggatc tcaagaagat 6480
cctttgatct tttctacggg gtctgacgct cagtggaaacg aaaactcacg ttaagggatt 6540
ttggatcatga gattatcaaa aaggatcttc acctagatcc ttttaaatta aaaatgaagt 6600
tttaaatacaa tctaaagtat atatgagtaa acttggtctg acagttacca atgcttaatc 6660
agtgaggcac ctatctcagc gatctgtcta tttcgttcat ccatagttgc ctgactcccc 6720
gtcgtgtaga taactacgat acgggagggc ttaccatctg gcccagtgcc tgcaatgata 6780
ccgcgagacc cacgctcacc ggctccagat ttatcagcaa taaaccagcc agccggaagg 6840
gccgagcgca gaagtgggcc tgcaacttta tccgcctcca tccagtctat taattggtgc 6900
cggaagcta gagtaagtag ttcgccagtt aatagtttgc gcaacgttgt tgccattgct 6960
acaggcatcg tgggtgacacg ctctgctgtt ggatggctt cattcagctc cggttcccaa 7020
cgatcaaggc gagttacatg atcccccatg ttgtgcaaaa aagcggttag ctcttctcgt 7080
cctccgatcg ttgtcagaag taagttggcc gcagtgttat cactcatggc tatggcagca 7140
ctgcataatt ctcttactgt catgccatcc gtaagatgct tttctgtgac tggtgagtac 7200
tcaaccaagt cattctgaga atagtgtatg cggcgaccga gttgctcttg cccggcgtca 7260
atacgggata ataccgcgcc acatagcaga actttaaaag tgctcatcat tggaaaacgt 7320
tcttcggggc gaaaactctc aaggatctta ccgctgttga gatccagttc gatgtaaccc 7380
actcgtgcac ccaactgatc ttcagcatct tttactttca ccagcgtttc tgggtgagca 7440
aaaacaggaa ggcaaaatgc cgcaaaaaag ggaataaggc cgacacggaa atgttgaata 7500
ctcatactct tcctttttca atattattga agcatttatc agggttattg tctcatgagc 7560
ggatacatat ttgaatgtat ttagaaaaat aaacaaatag gggttccgcg cacatttccc 7620
cgaaaagtgc cac 7633

```

<210> 10

<211> 30

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
Adaptor-Primer

<400> 10

atatatctgc agggagccac ggccgtccac

30

<210> 11

<211> 27

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
Adaptor-Primer

<400> 11

tatcccgggc ccgtgcctgg acgggaa

27

<210> 12

<211> 30

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
Adaptor-Primer

<400> 12

atatatctgc agtctagaac tagtgatcc

30

<210> 13

<211> 30
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
Adaptor-Primer

<400> 13
atatattacg tagtttgtcc gtgaacttca

30

<210> 14
<211> 41
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
Oligonukleotid

<400> 14
gtacacaggc agctagctct cgaaacctcg ctcgaaacgc a

41

<210> 15
<211> 41
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
Oligonukleotid

<400> 15
catgtgtccg tcgatcgaga gctttggagc gagctttgcg t

41

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

National Application No
PCT/EP2004/011214

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C12N15/82

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	MAUCH F. ET AL: "differential induction of distinct glutathione-S-transferase of wheat by xenobiotics and pathogen attack" PLANT PHYSIOL, vol. 102, 1993, pages 1193-1201, XP002313139	1-26
A	XU F. ET AL: "tandemly duplicated safener induced glutathione s-transferase genes from triticum tauschii contribute to genome and organe-specific expression in hexaploid wheat" PLANT PHYSIOL, vol. 130, 2002, pages 362-373, XP002313140	1-26

☐ Further documents are listed in the continuation of box C.

☐ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

12 January 2005

Date of mailing of the international search report

01/02/2005

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Keller, Y

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 C12N15/82

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 7 C12N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	MAUCH F. ET AL: "differential induction of distinct glutathione-S-transferase of wheat by xenobiotics and pathogen attack" PLANT PHYSIOL, Bd. 102, 1993, Seiten 1193-1201, XP002313139	1-26
A	XU F. ET AL: "tandemly duplicated safener induced glutathione s-transferase genes from triticum tauschii contribute to genome and organe-specific expression in hexaploid wheat" PLANT PHYSIOL, Bd. 130, 2002, Seiten 362-373, XP002313140	1-26



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

12. Januar 2005

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

01/02/2005

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Keller, Y

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record.**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☒ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER: _____**

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.